

Titre: Étude du comportement de cellules endothéliales de l'aorte
cultivées sur des fibres électrofilées de PET sous conditions
physiologiques de cisaillement

Auteur: Claudia Patricia Torres
Author:

Date: 2012

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Torres, C. P. (2012). Étude du comportement de cellules endothéliales de l'aorte
cultivées sur des fibres électrofilées de PET sous conditions physiologiques de
cisaillement [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/959/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/959/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Mario Jolicoeur, & Abdellah Ajji
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE CELLULES ENDOTHÉLIALES DE
L'AORTE CULTIVÉES SUR DES FIBRES ÉLECTROFILÉES DE PET SOUS
CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES DE CISAILLEMENT

CLAUDIA PATRICIA TORRES
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
NOVEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE CELLULES ENDOTHÉLIALES DE
L'AORTE CULTIVÉES SUR DES FIBRES ÉLECTROFILÉES DE PET SOUS
CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES DE CISAILLEMENT

présenté par : TORRES Claudia Patricia

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. TAVARES Jason-Robert, Ph.D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. AJJI Abdellah, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

Mme JONES Elizabeth, Ph.D., membre

DÉDICACE

À ma famille

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de recherche Pr. Mario Jolicoeur pour l'opportunité qu'il m'a offerte, son aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer. Merci aussi à mon co-directeur de recherche Pr. Abdellah Ajji pour avoir accepté de valoriser mon travail.

Je souhaite aussi remercier à mon ami Alex, que je respecte et apprécie énormément. Il s'est toujours montré à l'écoute et disponible pour moi, même avec la distance. À Gwen pour m'offrir une sincère amitié et pour me donner ses conseils afin d'améliorer mon français. À Monica qui m'a aidé avec la microscopie électronique, mais surtout pour son amitié. À Viorica, qui a partagée son temps et ses connaissances avec moi. À Afra qui m'a appris l'art de la culture cellulaire.

Merci à mes collègues qui m'ont apportés leur aide et leur assistance : Cédric, Zahra, Ines, Atefeh, July, Charles, Fred, Benoît, Loïc, Samantha, Nesrine, Yuang, et Jingkui.

À Vilma, à qui j'aimerais exprimer toute ma gratitude. Ses mots et sa confiance envers moi m'ont encouragée dans les moments difficiles.

Mes plus forts remerciements s'adressent à ma famille qui a été ma force et mon inspiration. À mes parents pour tous leurs efforts. Ma mère qui est ma lumière et qui m'a démontré que dans la vie il n'y a pas d'obstacles pour parvenir à accomplir les désirs et les rêves. Mon père qui m'a enseigné la sagesse et qui m'a fait comprendre que les mots ne sont pas nécessaires pour démontrer que l'on aime. À ma petite sœur, que j'adore, et à sa passion pour atteindre l'excellence. À mon adorable Wilson, le soleil de mes jours, qui a décidé de vivre une aventure fantastique avec moi.

Merci au gouvernement canadien pour l'aide financière que j'ai reçue et qui m'a permis de suivre mes études de maîtrise.

Finalement, merci aux professeurs Jason Tavares et Elizabeth Jones d'avoir accepté de juger mon travail.

RÉSUMÉ

Depuis près de 50 ans, des techniques de génie tissulaire ont été développées afin de créer des alternatives efficaces au traitement de l'athérosclérose. Aussi, ces dernières années, les structures hybrides faites de biopolymères et de cellules ont particulièrement attiré l'attention de la communauté pour leur capacité à mimer la réalité biologique des vaisseaux sanguins. Une variété de polymères synthétiques et naturels ont été déjà utilisés pour créer des greffons biocompatibles et biostables, permettant la croissance cellulaire. Les pratiques de culture cellulaire *in vitro* courantes ont pu être adaptées à la réalité d'une croissance sur biomatériaux, avec l'objectif de préserver et de maintenir la viabilité ainsi que le phénotype des cellules en contact avec ces biomatériaux. Cependant, la réponse immunitaire engendrée par l'introduction de ces biomatériaux, le manque de croissance d'un endothélium viable sur les structures synthétiques, et l'absence de propriétés mécaniques adéquates des matériaux, limitent le temps de vie des greffons vasculaires après la transplantation. De plus, des problèmes de thrombogénicité et d'adaptation élastique sont encore observés lors de remplacements vasculaires de petit diamètre, ce qui menant à un échec éventuel des greffons.

La présente étude est donc basée sur l'utilisation de structures polymériques non-tissées, au diamètre de fibres nanométrique, dont on suggère qu'elles pourraient améliorer la croissance et l'adhérence des cellules sous des conditions statiques et dynamiques. Ainsi, une nouvelle structure nanométrique non-tissée de polyéthylène téréphthalate (PET) fabriquée par la technique d'électrofilage et récemment mise au point par le groupe de recherche, a été utilisée pour supporter la formation *in vitro* d'un endothélium par culture de cellules endothéliales de l'aorte d'origine humaine (HAoEC). L'objectif de ce projet de maîtrise a consisté en la caractérisation de l'adhérence cellulaire sous conditions de stress hydrodynamiques. La réponse morphologique des cellules a été caractérisée par l'observation de l'évolution du cytosquelette et des liaisons intercellulaires, sous des conditions de cisaillement physiologique. Des essais en conditions dynamiques ont été effectués en chambre de culture permettant l'imposition d'un flux laminaire, par alimentation d'un milieu de culture oxygéné. Les tests ont été classifiés en deux groupes : « court terme », pour une durée de 20 min, et « long terme » sur des durées de 6 et 12 h. La distribution des filaments d'actine et les liaisons entre les cellules, évaluée selon le niveau

d'expression de la cadhérine vasculaire (VE-cadhérin), ont été observées afin d'évaluer les effets d'imposer un flux laminaire cisailant. Les résultats ont montré que les cellules (HAoEC) survivent et demeurent adhérentes (~100%) après un traitement de 20 min, et ce, même sous des conditions extrêmes de cisaillement (26 dyn cm^{-2}). Toutefois, les résultats « long terme » montrent des détachements de 35% après 6 h et de 70% après 12 h en condition de cisaillement. Pendant ces deux périodes de temps, les cellules ont développé de fortes liaisons entre elles, tel que suggéré par le détachement de larges plaques de cellules. Des changements significatifs dans la distribution des fibres d'actine, et de l'expression de la cadhérine vasculaire, ont également été observés, suggérant le développement d'un processus adaptatif aux changements abrupts de cisaillement.

ABSTRACT

For around 50 years, tissue engineering techniques have been explored to create new alternatives for the treatment of atherosclerosis. In the past years, hybrid structures made of polymers and cells have attracted most of the community's attention for its expected capacity to mimic the biological context of blood vessels. A variety of synthetic and natural polymers have been used to create biostable scaffolds that allow cell growth. Standard cell culture techniques and protocols have been adapted, with the objective to preserve and maintain the viability and phenotype of the cells, when cultured on these polymeric structures *in vitro*. However, the response of the immune system to invasive devices, the absence of a healthy grown endothelium and the lack of adequate mechanical properties of the materials limited the the long term success of the grafts. Trombogenicity and compliance mismatch are still two common unsolved problems following the transplant of small diameter vascular replacements, normally leading to imminent graft failure.

The present master's study started from the statement that non-woven structures, with fiber diameter at the nano-scale size, might enhance cell growth and adherence under both static and dynamic conditions. Therefore, a novel non-woven nano-PET structure, obtained by electrospinning, was used to grow HAoEC and cell response was characterized under shear stress conditions. The objective was to characterize the effects of submitting adhered cells to a physiological shear stress for different periods of time on cell adherence, as well as the cell cytoskeleton and junctions between cells. A parallel plate flow chamber was used and modified in order to cope with specific constraints of using a mat. Assays were classified in two groups: short (20 min) and long-term (6 and 12 h), monitoring cell adherence as well as the distribution of actin filaments and the expression of VE-cadherin. Results showed that short-term exposures did not affect cell adherence (~100%), maintaining a uniform endothelium, even under the exposure of extreme conditions of shear stress (26 dyn cm⁻²). On the other hand, long-term exposure times resulted in the disruption of the endothelium, with 35% of cell detaching after 6 h and 70% after 12 h. However, the observations over time showed that cells tried to adapt to the abrupt change in shear stress, adopting different morphologies and shapes, and creating strong bonds between them.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
1.1 Préambule.....	3
1.2 Les biomatériaux	3
1.2.1 Classification des biomatériaux	4
1.2.2 Modification de la surface des biomatériaux	5
1.2.2.1 Traitement au plasma	6
1.2.2.2 Méthodes chimiques par voie humide.....	6
1.2.2.3 Polymérisation de la surface	7
1.3 Les polymères synthétiques et leurs applications biomédicales	7
1.3.1 Le PET.....	8
1.3.2 Le PTFE	9
1.4 La technique d'électrofilage.....	10
1.5 Création des polymères biomimétiques	11
1.6 Les greffons vasculaires et les cellules endothéliales	12
1.6.1 La fonction des cellules endothéliales.....	13
1.6.2 L'artériosclérose et l'athérosclérose.....	14
1.7 L'endothélium et le cisaillement	15
1.8 L'effet mécanique et la réponse cellulaire	16
1.9 L'adhérence cellulaire	17

1.9.1 Les protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire et l'intégrité de l'endothélium ..	17
1.9.1.1 Le complexe d'acto-myosine et les intégrines	17
1.9.1.2 Les enzymes GTPases	19
1.9.1.3 La VE-cadhérine	19
1.10 La rigidité et la géométrie du substrat	21
CHAPITRE 2. OBJECTIF, HYPOTHÈSE ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE DE L'ÉTUDE	
.....	23
2.1 Objectif.....	23
2.2 Hypothèse.....	23
2.3 Méthodologie	23
2.4 Culture cellulaire	23
2.5 Évaluation des résultats.....	23
2.6 Interprétation des résultats	24
CHAPITRE 3. ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE CELLULES ENDOTHÉLIALES DE	
L'AORTE, CULTIVÉES SUR DES FIBRES ÉLECTROFILÉES DE PET, SOUS	
CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES DE CISAILLEMENT.....	25
3.1 Présentation de l'article	25
3.2 Article : HUMAN AORTIC ENDOTHELIAL CELL BEHAVIOUR ON ELECTROSPUN	
POLYETHYLENE TEREPHTHALATE MATS UNDER SHEAR FLOW CONDITIONS ...	26
3.2.1 Authors	26
3.2.2 Keywords	26
3.2.3 Abstract	26
3.2.4 Introduction	27
3.2.5 Materials and methods	29
3.2.5.1 Cell preparation	29
3.2.5.2 Non-woven PET structures	29
3.2.5.3 Shear-stress assay chamber	30
3.2.5.4 Cell seeding	32
3.2.5.5 Shear stress assays.....	33
3.2.5.6 Cell behavior monitoring	33

3.2.6 Results	34
3.2.6.1 Short-term hydrodynamic shear stress	35
3.2.6.2 Long-term hydrodynamic shear stress	37
3.2.7 Discussion	42
3.2.8 Conclusion.....	45
3.2.9 Acknowledgments	45
3.2.10 References	45
CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	50
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	53
BIBLIOGRAPHIE.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 : Facteurs d'importance pour la sélection d'un biomatériau pour des applications biomédicales (Adapté de Ramakrishna et al. 2001)	4
Table 3-1 : Physical characteristics of the non-woven PET structure A1	30

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1. PET tissé à l'échelle micrométrique et PET non-tissé (surface nanométrique A1)	8
Figure 1-2 : Montage de fibres de polymère par la technique d'électrofilage.....	10
Figure 1-3 : Structure des vaisseaux sanguins, extrait de TRENDS in Biotechnology. 2011, Vol.29, No.8.	13
Figure 1-4 : Influence du cisaillement sur la paroi des artères, extrait de Chiu et al., 2011. Physiol Re 91.	15
Figure 1-5 : Croquis d'une cellule adhérente sur un substrat, extrait de Kendall et al., 2011.....	18
Figure 1-6 : Contrôle de la maturation de l'adhésion cellulaire par l'action de la protéine Rho, extrait de Besser et al., 2007.	20
Figure 3-1 : Shear stress assay chamber and experimental set up (A). Parallel plate flow chamber parts (B). Parallel plate flow chamber assembled (C). Static inoculation on a non-woven PET structure previously fixed on the parallel plate flow chamber (D). SEM image of the non-woven PET mat (nano-surface A1) (E).	31
Figure 3-2 : Short-term (20 min) hydrodynamic shear stress assays. Fluorescent microscopy 5X (A, C, E, G). SEM (B, D, F, H). A and B control surfaces (static conditions). Test surfaces (dynamic conditions, from C to H) exposed 20 minutes under shear stress. C and D at 5 dyn cm ⁻² . E and F at 12 dyn cm ⁻² . G and H at 26 dyn cm ⁻²	36
Figure 3-3 : Tissue integrity after a 6h hydrodynamic shear stress assay. Control surface (A) evaluated under static conditions. Test surface (B) evaluated at 26 dyn cm ⁻² for 6 hours.....	37

Figure 3-4 : Cell junctions revealed by VE-cadherin staining after a 6h hydrodynamic shear stress assay. Cells directly seeded under static conditions on a tissue culture plate for 48 h (A). Control surface: cells inoculated under static conditions on a non-woven PET surface (B). PET mat after a 6 h assay (post 48 h under static conditions) at 26 dyn cm^{-2} (C).....38

Figure 3-5 : Actin fibers after a 6 h hydrodynamic shear stress assay. Control surface: Cells inoculated under static conditions on a non-woven PET surface (A). Cells directly seeded under static conditions on a tissue culture plate for 48 h (B). Test sample after 6 h (post 48 h under static conditions) at 26 dyn cm^{-2} (C).39

Figure 3-6 : Tissue integrity after a 12 h hydrodynamic shear stress assay. Control surface (A) evaluated under static conditions. Test surface (B) evaluated at 26 dyn cm^{-2} for 12 h.....40

Figure 3-7 : Cell junctions revealed by VE-cadherin staining after a 12-hour-test. Cells seeded directly on a tissue culture plate under static conditions (left) vs. test sample at 26 dyn cm^{-2} (right) after 12 h of inoculation (A). Other VE-cadherin images obtained after 12 h of flow at 26 dyn cm^{-2} (B) and (C).....41

Figure 3-8 : Actin fibers after a 12 h hydrodynamic shear stress test. Control surface seeded on PET (left) vs. test surface (right) at 26 dyn cm^{-2} for 12 h (A). White and black image of the actin fibers after 12 h under flow (B). Cell cytoskeleton after 12 h at 26 dyn cm^{-2} (C).41

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ATP	Adenosine TriPhosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CAMs	Cell Adhesion Molecules
DCM	DiChloroMéthane
EC	Endothelial Cells
ECM	Extra Cellular Matrix
FAs	Focal Adhesions
FBS	Fetal Bovine Serum
GTP	Guanosine TriPhosphate
HA	Hydroxyapatite
HAoEC	Human Aortic Endothelial Cells
HAoSMC	Human Aortic Smooth Muscle Cells
HBECs	Human Brain Endothelial Cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
MLC	Myosin Light Chain
NO	Nitric Oxide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polyethylene
PET	Polyethylene Terephthalate
PGI ₂	Prostacyclin
PGA	Polyglycolic acid
PLA	Poly(lactic acid)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PTFE	Polytetrafluoroethylene
SEM	Scanning Electron Microscopy
VE-cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VSMCs	Vascular Smooth Muscle Cells
VWF	Von Willebrand Factor

TF	Tissue Factor
TFA	TriFluoroAcetic
XPS	X-ray Photoelectron Microscopy

INTRODUCTION

L'athérosclérose est une maladie cardiovasculaire causée par une réduction localisée de flux sanguin (sténose) qui peut aller jusqu'au blocage total du vaisseau impliqué. Pendant des années, la chirurgie de pontage via des veines autologues a été employée comme traitement de référence. Cependant, certains problèmes subsistent tels que la nécessité de trouver des veines physiologiquement appropriées pour effectuer la transplantation [1]. Également, malgré certains avancements [2], le transplant d'homogreffes (via des donneurs cadavériques) n'a pas été effectué depuis 1960 en raison des problèmes de préservation et de détérioration de la greffe avec le temps. Parallèlement, la transplantation d'hétérogreffes (tissus issus d'espèces différentes) n'a pas démontré des résultats concluants par rapport à d'autres traitements [3], [4].

Ainsi, le développement de greffes vasculaires synthétiques représente une alternative intéressante. Cependant, l'utilisation de transplants constitués d'hybrides biomatériaux-cellules, obtenues avec l'application des techniques de génie tissulaire, ne réunissent pas encore les conditions nécessaires pour remplacer totalement les propriétés inhérentes aux vaisseaux sanguins d'origine [1]. Malgré le succès obtenu avec les greffons vasculaires synthétiques de grand diamètre, ceux de petit diamètre (inférieurs à 6 mm) montrent un taux de succès maximal de seulement 15 à 30%, cinq ans après la transplantation. Ceci étant dû à des problèmes de thrombogénicité ou de formation de caillots sanguins causée par l'agrégation plaquettaire, et d'hyperplasie ou augmentation du volume du tissu. Pour surmonter ces difficultés, des recherches de nouveaux biomatériaux et des nouvelles modalités de développement de greffes synthétiques ont été effectuées au cours des dernières années [5], et ce projet de recherche s'inscrit dans cette voie.

Ainsi, ce mémoire de maîtrise est organisé comme suit. Le premier chapitre consiste en une revue de littérature portant sur les biomatériaux, en mettant l'accent sur le PET, la technique d'électrofilage, les greffes vasculaires, les contraintes de cisaillement et l'adhérence cellulaire. Le deuxième chapitre regroupe l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus et analysés dans ces travaux de maîtrise, et correspond au manuscrit qui a été soumis au journal *Journal of Biomedical Nanotechnology*. Ce chapitre montre de façon détaillée la méthodologie employée pendant le développement des tests, de même que l'analyse des résultats obtenus. Le dernier chapitre propose des éléments de discussion reliés aux résultats. Finalement, le document se clôt par une

conclusion et des recommandations pouvant guider la suite travaux des présents travaux de recherche.

CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Préambule

L'utilisation de biomatériaux polymériques, en combinaison avec la culture cellulaire *in vitro*, a largement contribué à l'émergence et au développement de la régénération tissulaire au cours des dernières années. Le succès des avancements dans ce domaine résulte de la combinaison de différentes disciplines tels que la médecine, la science des matériaux et le génie tissulaire [6].

Pendant plus d'un demi-siècle, les chercheurs ont travaillé à la création de nouveaux substituts vasculaires synthétiques pouvant remplacer efficacement la fonction des tissus naturels [1]. Plusieurs matériaux polymériques sont inertes et de ce fait offrent un minimum d'interaction avec le sang et les tissus. De plus, comme l'objectif ultime de la communauté est de développer un matériau approprié pour le design de greffons vasculaires qui possèderaient des propriétés de résistance à la thrombogénicité et à l'occlusion après le transplant, la sélection d'un tel matériau dépendra de plusieurs critères spécifiques. Pour cette raison, une attention particulière est mise sur certains aspects de la conception du matériau comme par exemple, ses propriétés mécaniques et chimiques, sa porosité, sa biocompatibilité, et ses propriétés élastiques [6]. Tous ces facteurs peuvent directement influencer, positivement ou négativement, sur les processus de différenciation, de croissance et d'adhésion cellulaire sur la surface polymérique utilisée [7]. De manière générale, la nouvelle structure substitut doit être intégrée au système biologique et y restaurer le flux sanguin, tout en respectant au mieux le fonctionnement originel du système.

1.2 Les biomatériaux

Les biomatériaux peuvent être naturels, synthétiques ou une combinaison des deux. Ils sont utilisés pour remplacer des tissus du corps humain tout en conservant la fonction. Chaque matériau présente ses avantages propres en fonction de ses caractéristiques et le type d'applications biomédicales pour lequel il sera utilisé [8]. On peut distinguer différents critères venant guider le choix d'un biomatériau, dont le Tableau 1.1 en présente la synthèse.

Tableau 1-1 : Facteurs d'importance pour la sélection d'un biomatériau pour des applications biomédicales (Adapté de Ramakrishna et al. 2001)

Propriétés	Description
Chimiques/biologiques	<p>Composition chimique et biologique</p> <p>Surface modifiable</p> <p>Bio-fonctionnalité : Non-thrombogène ou favorable à l'adhésion cellulaire.</p> <p>Bio-inerte : Non-toxique, non-irritante, non-allergique, non-cancérogène, etc.</p> <p>Bio-actif</p> <p>Biodégradable</p> <p>Stable : Résistant à la corrosion, l'hydrolyse, l'oxydation, etc.</p>
Physiques	Densité, topologie de la surface (texture et rugosité), forme, porosité, géométrie, conductivité électrique, couleur, etc.
Mécaniques	Elasticité, rigidité, ténacité à la rupture, résistance à la fatigue et à l'abrasion, etc.

1.2.1 Classification des biomatériaux

Lors de leur implantation, les biomatériaux entrent en contact direct avec les fluides du corps, le sang, les protéines, les cellules, et de cette façon, ils sont intégrés aux tissus des alentours [9]. Une intégration appropriée est un facteur critique parce qu'elle déterminera le temps et le processus de guérison du tissu affecté. Selon le niveau d'intégration, un biomatériau peut être bioinerte, bioactif ou biorésorbable. Un matériau bioinerte aura très peu d'interaction avec le tissu

(i.e. acier inoxydable, titane, etc.), un matériau bioactif aura l'habilité d'interagir avec le tissu (i.e. HA (hydroxyapatite) et bioverre) sans générer de réactions pathologiques, et un biomatériau biorésorbable servira de support pour la croissance de nouveau tissu avant qu'il soit résorbé [8].

De façon générale, on peut classifier les biomatériaux selon qu'ils soient constitués de métaux, céramiques, polymères et composites. Les métaux sont d'excellents fournisseurs de caractéristiques mécaniques spécifiques, mais leur durée de vie est limitée due à des problèmes de corrosion quand ils sont en contact avec l'environnement biologique [10]. Ainsi, ils peuvent induire la formation de complexes inappropriés de métalloprotéines qui vont influencer le développement de la fonction cellulaire. Les céramiques présentent une meilleure biocompatibilité comparé aux métaux, et la corrosion n'est pas un problème ; cependant, elles sont fragiles et possèdent une ductilité faible [11]. Les polymères sont plus faciles à traiter que les métaux et les céramiques. Ils peuvent être synthétisés pour obtenir des caractéristiques chimiques, physiques et biomimétiques différentes [12]. Par exemple, leur structure peut être ajustée par variation des conditions du procédé, leur poids moléculaire, leur densité et leur structure moléculaire (structure réticulée), et les conditions de l'environnement (température, pH, etc.). L'ensemble de ces caractéristiques explique que les polymères sont plus fréquemment utilisés pour l'ingénierie des tissus mous et lors d'applications telle que la livraison de médicaments [12]. Les composites correspondent à une combinaison hétérogène de deux matériaux ou plus. Avec ce type de matériaux, il est possible de manipuler certaines caractéristiques mécaniques et structurelles qui ne sont pas présentes dans un seul des matériaux utilisés, et ainsi d'obtenir les propriétés nécessaires pour une application donnée de manière à viser une réponse spécifique du tissu après implantation. Comme exemples de ces biomatériaux, on trouve le HA/collagène, le HA/PLGA et le HA/PE [8].

1.2.2 Modification de la surface des biomatériaux

La réponse initiale du tissu, face à la présence du biomatériau, dépend globalement des caractéristiques de sa surface [8],[13]. L'objectif général de la modification de la surface de biomatériaux est d'en conserver les propriétés globales tout en permettant d'améliorer sa

biocompatibilité ainsi que les processus d'intégration au tissu. Cette modification sera caractérisée par l'altération chimique ou physique des molécules se trouvant à sa surface, ou par un revêtement biocompatible et/ou bioactif [14],[8]. Par conséquent, on visera, entre autres, une augmentation des forces de liaison, et une amélioration de la résistance à la corrosion, la biocompatibilité, l'hémocompatibilité, l'adsorption de protéines, et l'adhésion cellulaire [13].

1.2.2.1 Traitement au plasma

Cette technique utilise différentes sources de plasma pour générer l'éjection d'un gaz ionisé pour induire une modification de la surface nanométrique d'un polymère sans utiliser des solvants, minimisant ainsi la génération de déchets chimiques, ou ne causant pas la dégradation du biopolymère avec des traitements chimiques [15]. Les résultats de Tavares et al. montrent que la fixation de nanoparticules sur la surface d'un matériau peut améliorer sa réactivité et son caractère hydrophile ou hydrophobe [98]. Une sélection appropriée de la source de plasma permettra l'incorporation de différents groupements fonctionnels sur la surface du polymère, ce qui améliorera sa biocompatibilité et favorisera l'attachement ultérieur de molécules bioactives et bioattractives ou répulsives [16]. Par exemple, des traitements avec l'oxygène, l'ammoniac, ou l'air, vont créer des groupements carboxyl ou amine primaire sur la surface. Par la suite, des composants protéiques de la matrice extracellulaire tels que la gélatine ou le collagène peuvent être incorporés et liés pour améliorer l'adhérence et le développement cellulaire [17].

1.2.2.2 Méthodes chimiques par voie humide

Par cette technique, les biomatériaux sont traités avec des réactifs liquides (acides ou bases) pour générer des groupements réactifs fonctionnels sur leur surface. Le principe est basé sur la scission aléatoire des liaisons ester rencontrées dans la structure du polymère, ce qui mène à la création des groupements carboxyl et hydroxyl [16]. Cette technique est capable d'aller plus profondément à l'intérieur du matériau, permettant la pénétration de substrats poreux (3D) et fibreux. La durée de l'hydrolyse et la concentration des réactifs hydrolysants sont de grande

importance pour l'efficacité de la procédure et le changement minimal des propriétés globales du biomatériau [16], [18]. Malheureusement, cette technique est non-spécifique et le degré de fonctionnalisation est difficilement reproductible entre des polymères de poids moléculaire différents [15].

1.2.2.3 Polymérisation de la surface

Essentiellement, les polymères synthétiques présentent un caractère hydrophobe à leur surface. Ce caractère favorisera la motilité cellulaire et les changements de la conformation des protéines dans l'interface cellule-polymère [13]. Cependant, un caractère hydrophile contrôlé doit être créé pour favoriser des réponses cellulaires spécifiques et garantir l'adhérence cellulaire [16]. La technique de polymérisation de la surface permet une augmentation de l'hydrophilie et favorise l'introduction de groupements multifonctionnels. Ces derniers permettront l'immobilisation covalente de molécules bioactives pour faciliter les processus cellulaires de différenciation, de prolifération et d'adhésion [19]. Les techniques de traitement au plasma et la radiation par UV sont communément utilisées pour générer des radicaux libres pour la polymérisation [16]. Un exemple de cette technique est la modification d'une surface de PET par l'utilisation de l'acide méthacrylique [20].

1.3 Les polymères synthétiques et leurs applications biomédicales

Les polymères synthétiques sont des biomatériaux qui sont largement utilisés actuellement car ils peuvent être adaptés afin de fournir des caractéristiques fonctionnelles spécifiques similaires à celles des tissus naturels [8]. Par ailleurs, ils possèdent les propriétés mécaniques requises pour des applications biomédicales, et leur surface peut être modifiée afin d'accroître leur biocompatibilité avec les tissus du corps. On peut mentionner quelques exemples de biopolymères souvent utilisés : le collagène, la gélatine ou encore le chitosan sont, tout d'abord, des exemples de biopolymères naturels biodégradables. Le PLA, le PGA, et le PLGA sont de

polymères synthétiques biodégradables. Finalement, le PMMA, le PE, le PET et le PTFE sont des polymères dits synthétiques non-biodégradables [8].

Les polymères synthétiques sont classifiés selon leur structure, le type de réactions utilisées pour les synthétiser, leurs propriétés fonctionnelles, leur niveau de dégradation, et leur application.

Notre revue de littérature sera axée sur le PET et le PTFE pour établir une comparaison entre deux des biopolymères les plus utilisés dans le domaine de la fabrication de greffons vasculaires.

Aussi, on portera une attention particulière au cas du PET car notre objectif de recherche est dirigé sur les avantages que ce polymère par rapport à d'autres matériaux.

1.3.1 Le PET

Le polyéthylène téréphtalate (PET) est un polymère thermoplastique synthétisé par une réaction de polycondensation de l'éthylène glycol avec l'acide téréphtalique ou le diméthyle téréphtalate.

Le PET est un des polymères les plus utilisés depuis les années 50 en génie tissulaire, là où une haute résistance et une performance à long terme sont nécessaires [21]. Le PET a été largement utilisé pour le développement de greffons vasculaires en raison de ses excellentes propriétés de biocompatibilité, d'hydrophobicité, et la possibilité d'être traité pour obtenir des fibres synthétique tissées (orientées) ou non-tissées (aléatoires) [22] [23, 24] (Figure 1-1). Les fibres non-tissées de PET sont plus poreuses que les fibres tissées et confèrent aux greffons vasculaires une meilleure distensibilité radiale que les fibres tissées [25]. Cette dernière caractéristique permettra aux greffons faits de PET d'imiter la nature viscoélastique des artères et ainsi de s'adapter aux changements du flux sanguin [25].

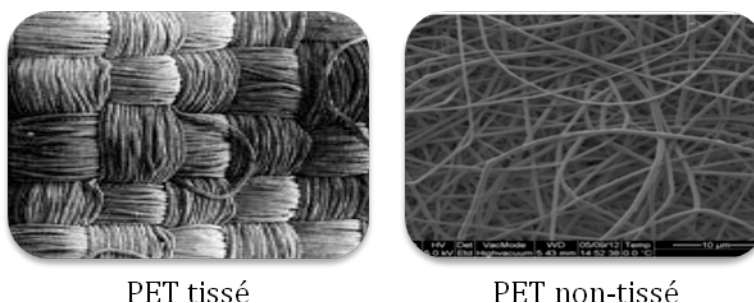


Figure 1-1. PET tissé à l'échelle micrométrique et PET non-tissé (surface nanométrique A1)

Les fibres non-tissées sont fabriquées à partir de la technique d'électrofilage, méthode avantageuse qui permet de contrôler l'orientation spatiale, le diamètre des fibres, et la porosité du matériau. Toutes ces caractéristiques spécifiques des fibres non-tissées de PET détermineront favorablement les propriétés mécaniques du greffon, la réponse biochimique des cellules et par conséquent, la performance de l'implant [25].

Malgré la composition inerte du PET, des techniques de fonctionnalisation tels que le traitement au plasma, et les méthodes humides par voie chimique, peuvent être appliquées aux surfaces de PET afin d'améliorer l'attachement et la viabilité cellulaire [23].

Le PET présente une meilleure stabilité que le PTFE [1] et peut rester presque intact plus de 10 ans après la transplantation [26]. Cependant, il peut avoir tendance à se dilater dans l'environnement artériel avec le temps [27], [28].

Actuellement, le PET est le polymère synthétique le plus utilisé pour effectuer des replacements aortiques et des conduits de petite taille pour des pontages fémoro-poplités [29]. Le taux de succès du PET dans la fabrication des greffons utilisés en bifurcation aortiques est de 93%, cinq ans après la transplantation [30].

1.3.2 Le PTFE

Le PTFE est un polymère expansé fabriqué par un processus d'extrusion, étirement et chauffage, résultant en un tube composé de membranes solides de formes irrégulières [1]. Son application médicale commence dans les années 60 avec la fabrication de valves artificielles pour le cœur. Le PTFE est une molécule stable, avec une surface électronégative qui permet de minimiser les réactions avec les composants du sang. Certains résultats suggèrent que la génération de dépôts plaquettaires est moins importante avec le PTFE qu'avec le PET, cependant leur taux de succès respectifs sont similaires [31]. Malgré les différences de propriétés chimiques et physiques de ces deux polymères, leur succès dans le développement de greffons vasculaires est comparable en tous points de vue [30], [32], [33], [34]. Par exemple, le développement de substituts aortiques atteint un taux de succès de 91-95% [26], taux similaire à celui du PET [30].

1.4 La technique d'électrofilage

Les greffons vasculaires peuvent être fabriqués par des fibres électrofilées de polymères avec des diamètres allant jusqu'à quelques nanomètres. Avec la technique d'électrofilage, il est possible de contrôler la porosité, le rapport surface-volume, et les propriétés mécaniques du matériau produit [35]. De la même façon, il est possible de générer des structures avec différentes conformations architecturales permettant de contrôler le diamètre et l'orientation des fibres produites [36]. La configuration de base d'un montage d'électrofilage, illustrée à la Figure 1-2, est constitué de trois éléments : une filière (spinneret), un collecteur, et une source de haute tension électrique [37]. La filière est connectée à une seringue servant de réservoir de polymère à electrofiler. Aussi, dans cette technique un champ électrostatique à haute tension est utilisé afin de charger la surface de la solution de polymère, et ainsi induire l'éjection d'un jet de liquide [38]. Le potentiel électrique est appliqué entre le courant de gouttelettes de polymère généré à la sortie d'un capillaire et sur le collecteur. Lorsque la force électrique surmonte la tension superficielle des gouttelettes, un jet de polymère est éjecté, est donc ramassé dans la contre-cathode (collecteur) [38], [39] (Figure 1-2). L'application constante de la force électrique sur le jet permet son étirement. Le jet chargé est ramassé dans le collecteur grâce à la différence de potentiel électrique qui existe entre la solution de polymère à la sortie du capillaire et celle du collecteur [40]. L'évaporation du solvant permettra la solidification partielle ou totale du jet et son accumulation sur le collecteur.

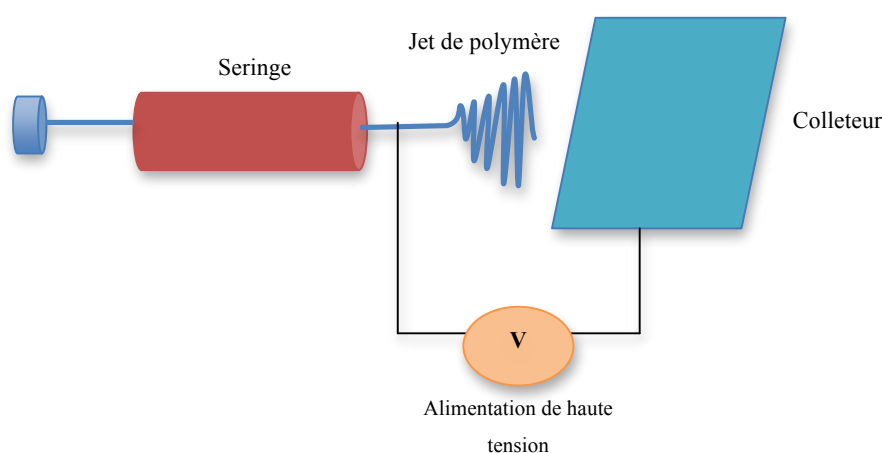


Figure 1-2 : Montage de fibres de polymère par la technique d'électrofilage

La morphologie des fibres obtenues par cette technique peut être contrôlée en modulant des paramètres (détaillés plus loin) tels que les propriétés de la solution de polymère, les données opérationnelles, mais également les conditions environnementales pendant la procédure de fabrication [36]. Les propriétés de la solution incluent son poids moléculaire, sa viscosité, sa conductivité, sa constante diélectrique et sa tension superficielle. L'ensemble de ces paramètres déterminera le diamètre des fibres. Le voltage, la distance entre le capillaire et le collecteur, le débit de la solution, le diamètre de la seringue et le mouvement rotatif du collecteur correspondent aux conditions opérationnelles. Ces caractéristiques doivent être bien contrôlées afin d'éviter des irrégularités dans les fibres [39]. Les conditions de l'environnement à l'intérieur de la chambre d'électrofilage incluent l'humidité, la température, la vitesse de l'air et la pression atmosphérique. L'humidité est le principal facteur de contrôle de la porosité sur la surface des fibres. Les pores commencent à être formés au-dessus d'un certain seuil d'humidité. L'augmentation contrôlée de l'humidité va aussi augmenter le nombre de pores et leur diamètre. Cependant, la formation précise des pores et leur texture dépendent de la formation d'empreintes générées suite à l'évaporation du solvant et à son étape de séparation [39].

Les caractéristiques physiques du matériau et de sa structure fibreuse vont lui conférer différentes propriétés mécaniques [24] et affecteront directement le comportement des cellules qui seront en contact avec sa surface [41], [42], [24].

Une structure nanométrique obtenue par électrofilage peut être similaire aux fibrilles protéiniques trouvées dans la matrice extracellulaire [43]. Chaque fibre individuelle donne un haut ratio surface-volume, ce qui permet une surface de contact élevée entre les cellules et les fibres [44]. L'avantage d'utiliser des polymères synthétiques est la très faible variation entre lots de fabrication, une manipulation facile, et des propriétés mécaniques et physiques reproductibles [43].

1.5 Création des polymères biomimétiques

Le défi principal qui attend la nouvelle génération de biopolymères est l'obtention de structures ayant une fonctionnalité biologique complexe et de biocompatibilité hautement spécifique [13]. Les matériaux biomimétiques correspondent à cette nouvelle génération de biopolymères où des

principes de fabrication aux niveaux micro et nano structuraux (comme l'électrofilage) imitent ou s'inspirent de mécanismes biologiques [40]. Cette nouvelle approche du génie tissulaire se concentre sur deux aspects : d'une part, l'optimisation des techniques de synthèse de structures polymériques, et d'autre part, des subtilités reliées à l'inoculation cellulaire [45], [46], afin d'obtenir des greffons efficaces et durables. Des molécules biologiquement actives, provenant d'un microenvironnement naturel, peuvent être ajoutées aux polymères afin d'obtenir des surfaces biomimétiques émulant la matrice extracellulaire et les caractéristiques structurales des tissus, pour accomplir des fonctions cellulaires déterminées (par exemple, le processus de cicatrisation normale et la régénération du tissu) [13]. Dans ce cadre, diverses fonctions biologiques seront créées à partir de l'incorporation, par exemple, d'enzymes pour catalyser des réactions particulières, de facteurs de croissance pour générer des endroits spécifiques de reconnaissance, d'actions et d'attachement, et du matériel génétique pour effectuer une transfection cellulaire dirigée vers la modification de traits et/ou fonctions spécifiques [13]. Cet objectif peut être également accompli par la modification de la surface du polymère à l'aide de macromolécules biologiques actives, tels que des polypeptides dérivés de la matrice extracellulaire, ou physiquement par la modification de la topographie de la surface au niveau nanométrique [47]. Dans cette tentative d'imiter l'activité biologique d'un environnement naturel, les nouveaux matériaux devraient avoir la capacité d'induire ou de moduler des réponses biologiques spécifiques *in vitro* et de diriger la formation de nouveau tissu *in vivo* [48], [49].

1.6 Les greffons vasculaires et les cellules endothéliales

Un passage obligé dans le processus de conception d'un greffon vasculaire synthétique en laboratoire, consiste en l'obtention d'un endothélium non-thrombogénique sur une surface synthétique. Puisque la fonction des cellules endothéliales (voir section suivante) est influencée par la composition chimique du biomatériau, sa structure, sa biocompatibilité ainsi que par les conditions dynamiques s'exerçant *in situ*, il est nécessaire de considérer *a priori* l'ensemble de ces facteurs *in vitro*, afin d'assurer la performance du greffon après la transplantation [50]. D'une part, les fibres synthétiques sont conçues pour incorporer et immobiliser des cytokines pro-angiogéniques et des facteurs de croissance [51], connus pour permettre la pénétration cellulaire à

l'intérieur des fibres sous des conditions statiques ou dynamiques [52]. D'autre part, tel qu'explicité à la section 1.4, des éléments tels que le diamètre des fibres et la densité des pores à la surface synthétique influenceront directement la qualité de l'endothélium généré [53]. Un endothélium solide et fortement adhérent est indispensable pour prévenir l'ablation non contrôlée des cellules endothéliales causée par le cisaillement généré par le flux sanguin et la possible exposition de la matrice extracellulaire [54].

1.6.1 La fonction des cellules endothéliales

L'endothélium est une monocouche de cellules localisées le long de la paroi luminale des vaisseaux sanguins (Figure 1-3). Sous l'endothélium se trouvent des couches concentriques qui constituent la matrice extracellulaire et des cellules qui, ensemble, forment la paroi des artères (Figure 1-4): l'intima constituée par du collagène, des protéoglycanes et des fibres élastiques ; la media qui a une couche organisée de cellules de muscle lisses et qui contrôle le diamètre interne du vaisseaux, et ainsi influence la pression sanguine ; et finalement l'adventice qui est formée par du tissu conjonctif et des cellules constituant l'interface entre le vaisseau et le tissu adjacent [55].

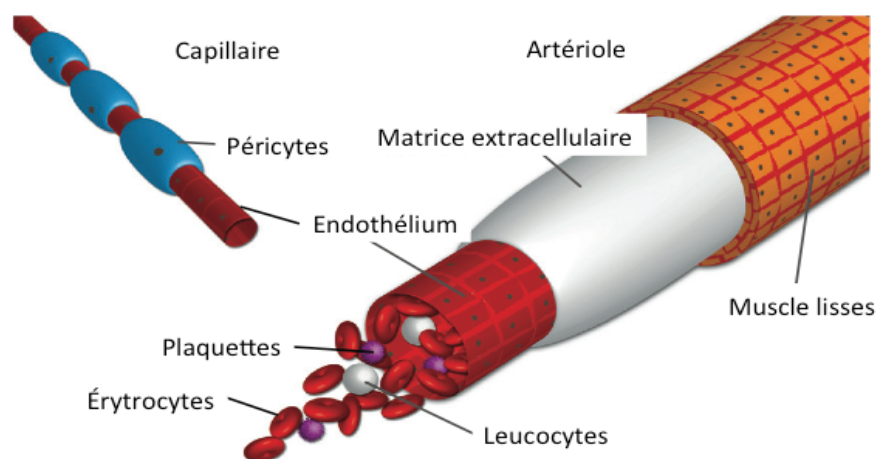


Figure 1-3 : Structure des vaisseaux sanguins, extrait de *TRENDS in Biotechnology*. 2011, Vol.29, No.8.

L'endothélium a comme fonction principale de maintenir une barrière semi-perméable aux macromolécules et aux fluides qui se trouvent entre le sang et l'espace interstitiel, mais aussi d'établir le gradient protéique requis pour l'atteinte de l'homéostasie des liquides [56].

Les cellules endothéliales génèrent une surface non-thrombogénique avec l'expression d'anticoagulants et d'agents fibrinolytiques tels que la thrombomoduline, le sulfate d'héparane, l'oxide nitrique (NO), et la prostacycline (PGI₂) [50] [57] [58]. Également en agissant sur la contraction du muscle lisse, ces cellules contrôlent le tonus des vaisseaux via des molécules régulant la vasodilatation (NO, PGI₂) et la vasoconstriction (endothéline). L'endothélium régule le remodelage vasculaire avec la formation et la sécrétion de molécules qui contrôlent la croissance (par exemple, le fibroblast growth factor-2) et des cytokines ; il maintient aussi la membrane basale (collagène et protéoglycanes) sur laquelle il repose et oxyde les lipoprotéines [50]. Les cellules endothéliales régulent la réponse inflammatoire en synthétisant des molécules d'adhésion sur la surface de la membrane. La perte progressive de la fonction des cellules endothéliales favorise un processus inflammatoire qui contribue à des états pathologiques qui à leur tour, mènent à différents troubles vasculaires tels que l'athérosclérose, la thrombose et leurs conséquences pathologiques [56], [57].

1.6.2 L'artériosclérose et l'athérosclérose

D'un côté, l'artériosclérose est définie comme l'épaississement et la perte d'élasticité des artères caractérisée par la réduction du diamètre interne des vaisseaux, ce qui affecte le taux de perfusion des organes. D'un autre côté, l'athérosclérose, un type d'artériosclérose, est une lésion endothéliale chronique caractérisée par un processus inflammatoire constant qui peut mener à la perte de la fonction métabolique et structurelle de l'endothélium. Ce changement chronique favorisera l'activation des cellules endothéliales et l'augmentation de l'expression des protéines d'adhésion cellulaire ("*cell adhesion molecules*" dites CAMs) promouvant l'attachement ferme des monocytes et des plaquettes à la paroi de l'endothélium. Les monocytes migrent vers l'intima et se différencient en macrophages. Les macrophages prennent les lipoprotéines de basse densité (LDL pour "*Low Density Lipoproteins*") et deviennent des cellules spumeuses. Les plaquettes, de leur côté, adhèrent à l'endothélium activé ou à des endroits nus de la matrice extracellulaire, où elles deviennent aussi actives. La migration de cellules de muscle lisse vers l'intima est stimulée

par l'activation de macrophages, de cellules endothéliales et de plaquettes. La situation se détériorera suite à la formation d'une plaque athérosclérotique qui va ensuite empêcher le flux sanguin approprié [55], [59]. Tous ces facteurs créeront des cycles répétés d'agrégation et d'adhésion de plaquettes qui favoriseront la formation de thrombus et, par conséquent, l'occlusion des vaisseaux sanguins.

En fonction de la gravité du problème de l'athérosclérose, des traitements pharmacologiques ou chirurgicaux, tels que les replacements vasculaires, sont appliqués.

1.7 L'endothélium et le cisaillement

Les cellules du corps sont constamment influencées par leur environnement et par des forces externes qui leur sont appliquées [60], [61]. Par exemple, l'endothélium étant en contact direct avec le flux sanguin, il doit supporter la majeure partie de la contrainte de cisaillement qui découle de celui-ci. Le cisaillement est une composante des forces de friction qui agissent parallèlement à la surface intérieure des vaisseaux sanguins (Figure 1-4)[62]. Des observations *in vivo* ont révélé que des variations du niveau de cisaillement jouent un rôle critique dans la régulation de l'homéostasie vasculaire [63], à travers le remodelage tissulaire, la variation de la morphologie des cellules et l'influence directe sur leur fonction [64], [65].

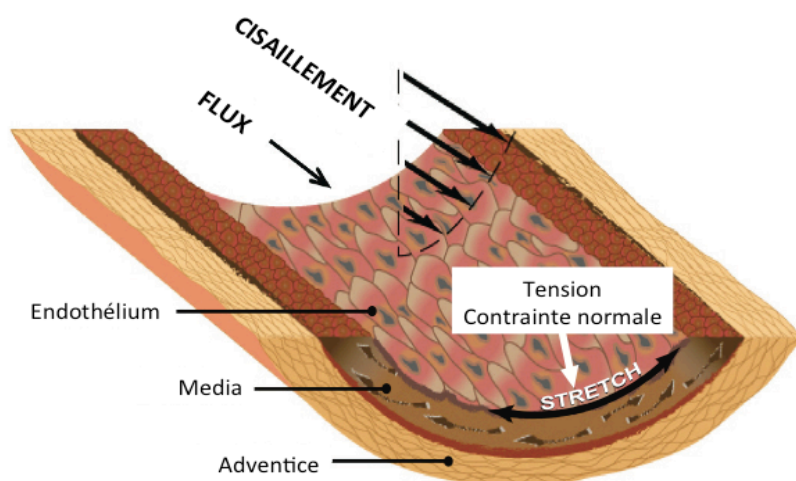


Figure 1-4 : Influence du cisaillement sur la paroi des artères, extrait de Chiu et al., 2011. *Physiol Re 91*.

Cependant, quand la force de cisaillement change, la génération d'une réponse artérielle correcte dépendra d'un endothélium intact et fonctionnel qui résiste aux nouvelles conditions dynamiques, en adaptant rapidement ses fonctions et sa structure [57]. Il est connu que les conditions hémodynamiques ne sont pas uniformes sur l'ensemble du système vasculaire [66]. Par exemple, il existe des endroits caractérisés par des conditions de flux laminaire et des valeurs élevées de cisaillement, où une forte expression des protéines spécialisées protège le système contre l'athérosclérose. Mais il existe également des endroits caractérisés par des courbatures, présentant un flux perturbé, où des changements abrupts et des valeurs faibles de cisaillement pourraient favoriser le développement de lésions athérosclérotiques [57].

1.8 L'effet mécanique et la réponse cellulaire

Malgré que la connaissance d'une relation étroite entre stimuli mécaniques et réponses cellulaires soit établie, il n'y a pas encore d'explications précises sur la manière dont les cellules ressentent ces forces, et comment ces stimuli est transformé ensuite en signaux biochimiques [60], [61], [67] ces derniers pouvant altérer la conformation physique du tissu au niveau nanométrique.

Les fibres du cytosquelette, celles de la matrice extracellulaire, et toutes les protéines qui connectent physiquement l'intérieur de chaque cellule avec son environnement sont les premiers éléments endurant les forces appliquées au tissu endothéliale. Comme cela a déjà été mentionné, l'endothélium a une fonction de barrière semi-perméable, et la majeure partie de sa résistance aux forces externes est tient aux jonctions entre les cellules et ses molécules d'adhésion (cadhérines). Ces liaisons maintiennent les cellules connectées par leur cytoplasme et font le lien avec le cytosquelette cellulaire à travers les fibres d'actine [68]. Par ailleurs, les contacts entre la matrice extracellulaire et les cellules, qui sont composés principalement d'intégrines, leurs donnent un support structurel et leurs confèrent un contrôle du comportement cellulaire [69].

Les forces qui agissent sur les cellules et qui affectent directement ses unions et liaisons avec la matrice extracellulaire peuvent être générées de façon externe, par exemple sous l'influence du cisaillement, ou par la contraction du cytosquelette [70]. La combinaison de ces forces va engendrer une tension *à posteriori* sur différentes protéines, et un changement de leur structure et

leurs fonctions. Quand les protéines subissent une certaine force , leur structure peut changer et créer un nouveau motif protéique qui pourrait définir la traduction des forces mécaniques en signaux biochimiques [67], [71], et en même temps affecter, tant positivement que négativement, l'adhérence cellulaire.

1.9 L'adhérence cellulaire

Les cellules endothéliales possèdent une caractéristique adaptative d'adhérence qui les amène à un état d'équilibre dynamique. Cette capacité d'adhésion doit favoriser un contact actif avec la matrice extracellulaire qui permettra aux cellules de maintenir leur métabolisme et de contrôler leur processus d'adaptation, de différenciation et leur changement de morphologie en fonction des forces mécaniques, i.e. leur phénotype. Ceci est un processus complexe, indispensable pour le contrôle de l'homéostasie, qui est seulement possible quand les cellules contrôlent et ajustent leurs forces d'adhésion avec leur environnement [72].

1.9.1 Les protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire et l'intégrité de l'endothélium

1.9.1.1 Le complexe d'acto-myosine et les intégrines

Les cellules sont limitées par une membrane qui sépare le cytoplasme de la matrice extracellulaire (Figure 1-5). Cette membrane contient une très grande quantité de protéines, tels que les canaux ioniques qui permettent le transport et échanges d'ions, et les intégrines qui interviennent directement dans le processus d'adhérence. Ces molécules peuvent se lier sélectivement à des protéines localisées dans la matrice extracellulaire d'un substrat [73], et créer de fortes liaisons améliorant l'attachement des cellules et de cette façon les maintenir en vie [72].

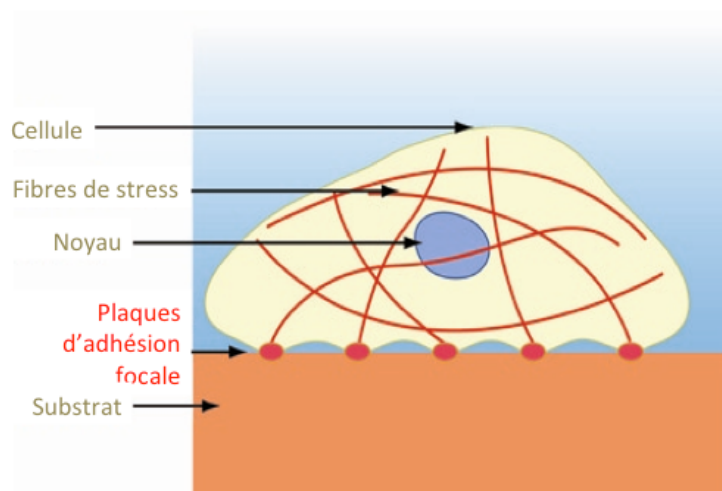


Figure 1-5 : Croquis d'une cellule adhérente sur un substrat, extrait de Kendall et al., 2011.

Le cytosquelette, structure localisée dans le cytoplasme, entre autre, a pour fonction de maintenir l'intégrité du volume cellulaire [74]. Il est composé principalement de filaments d'acto-myosine, de microtubules et de filaments intermédiaires [75]. Le complexe d'acto-myosine est la principale structure qui influence l'adhésion cellulaire. Elle est constituée de filaments d'actine qui peuvent être polymérisés ou dépolymérisés pendant le processus de migration cellulaire. Les complexes constitués de protéine moteur myosine s'adhèrent aux fibres d'actine et génèrent des forces mécaniques carburant à l'hydrolyse d'ATP. Ces forces permettent la réorganisation de la structure des filaments du cytosquelette, et la contraction cellulaire pour arriver à obtenir une géométrie du tissu favorisant l'adhésion cellulaire [74], [75]. Quand les complexes d'acto-myosine sont liés à des structures plus complexes, ils portent le nom de fibres de stress (stress fibers). Ces fibres définissent les propriétés mécaniques des cellules et permettent l'adaptation des efforts au besoin [74]. Cependant, pour accomplir cette fonction, les cellules doivent toujours établir une connexion entre leur cytosquelette et leur environnement via des liaisons protéiques localisées dans le cytoplasme (taline, vinculine, paxiline, etc.) et des intégrines qui font la connexion avec la matrice extracellulaire [71]. Plusieurs intégrines vont se lier au même endroit avec d'autres protéines de liaison, en formant des assemblages macromoléculaires appelés adhésions focales (focal adhesions (FAs)) [76], structures vitales pour l'adhérence globale de la cellule.

1.9.1.2 Les enzymes GTPases

Les cellules ont l'habilité de percevoir leur environnement et de répondre à des changements mécaniques pendant leur processus d'adhésion. La formation de points d'adhésions focales comprend un ensemble d'actions hiérarchisées, constitué d'évènements moléculaires séquentiels qui vont évoluer dans le temps [77]. Les premiers contacts sont réalisés par des liaisons entre intégrines et la matrice extracellulaire, puis vont conduire à des recrutements de protéines (comme la vinculine et la taline) qui caractériseraient la maturation des adhésions focales [77], [78]. L'assemblage des fibres de stress (fibres d'actine tendues par la myosine II) et les adhésions focales dépendent de l'action d'une famille de GTPases appelée Rho [79]. Aussi, la protéine RhoA est la composante principale d'une boucle de rétroaction (feedback loop) qui stabilise la maturation de l'adhésion cellulaire. Grâce à l'action de la myosine II, les fibres de stress sont toujours soumises à des tensions qui génèrent des forces sur les points d'adhésion et qui mènent également à sa croissance latérale par les stimuli générés par la contraction de la protéine Rho [80]. Ces stimuli se propagent à travers le cytoplasme des cellules et mène à l'activation du processus de polymérisation de l'actine et la phosphorylation de la chaîne de la myosine (myosin light chain MLC), augmentant ainsi l'activité motrice de la cellule. Toute cette activité augmente la contraction cellulaire et le niveau des forces produites dans les adhésions focales. De cette façon, le boucle positive de rétroaction est fermée et la formation des adhésions focales est contrôlée [81] (Figure 1-6). Le développement de ces processus dépendra de la contraction du complexe d'acto-myosine, de la distance qui existe entre les liaisons d'intégrines, et de la rigidité de la matrice extracellulaire.

1.9.1.3 La VE-cadhérine

L'attachement cellulaire à la matrice extracellulaire est déterminant pour que les cellules puissent vivre. Quand le processus d'adhésion a atteint la maturation, les cellules sont capables de résister à des forces mécaniques sans se détacher. Ces forces mécaniques peuvent être transmises au cytosquelette (complexe acto-myosin), et de cette façon être disséminées à d'autres endroits de la cellule. Mais, de la même façon que les cellules doivent se maintenir adhérentes à la matrice extracellulaire, elles doivent aussi rester ensemble pour vivre et supporter les forces qui agissent

sur elles. Ces types d'unions sont préservés par des liaisons cadhérine-cadhérine [82]. Ces unions présentent un caractère dynamique, car les cellules sont en mouvement constant, en particulier lors de processus tels que l'angiogenèse, la morphogénèse, et le remodelage vasculaire [83]. Même si les cellules endothéliales ont la capacité de faire des mouvements de façon indépendante, le tissu doit subir les changements de manière coordonnée. La VE-cadhérine est la molécule d'adhésion la plus importante qui maintient l'intégrité des unions entre les cellules et qui régule la perméabilité des vaisseaux sanguins [84], [82] au moyen d'une action mécanique.

Envisageant l'importance des fibres d'actine et de la VE-cadhérine pour le développement des premiers contacts d'attachement, de la maturation du processus d'adhésion cellulaire, et de l'intégrité du tissu endothélial, on a choisi de diriger notre recherche vers l'étude de ces protéines. La méthodologie et les résultats de cette étude sont discutés au chapitre 2.

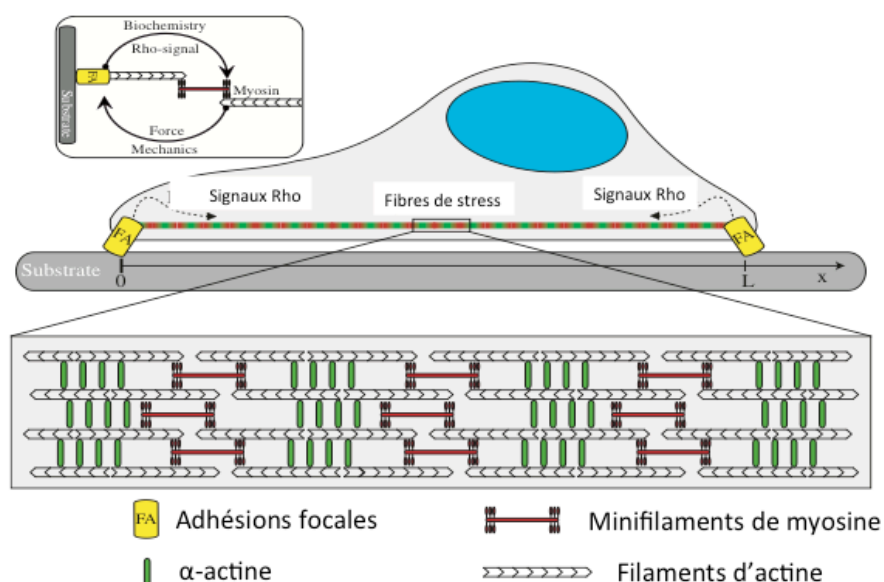


Figure 1-6 : Contrôle de la maturation de l'adhésion cellulaire par l'action de la protéine Rho, extrait de Besser et al., 2007.

1.10 La rigidité et la géométrie du substrat

De la même façon que les cellules adhèrent à la matrice extracellulaire, elles peuvent adhérer aux substrats polymériques qui constituent les greffons synthétiques vasculaires. Aussi, elles présentent une habilité à déformer les substrats flexibles via les fibres du cytosquelette [85].

Dans les tissus du corps, quand les unions cellule-cellule et cellule-matrice deviennent stables, l'activité cellulaire subséquente dépendra des propriétés physiques de l'environnement extracellulaire dont la rigidité de la matrice extracellulaire [60]. La rigidité et la géométrie de l'environnement cellulaire sont deux propriétés constamment évaluées par les cellules à travers leur mécanisme de motilité intracellulaire. En effet, ces deux facteurs sont critiques pour la régulation des processus cellulaires tels que l'adhésion, la différenciation, la migration, et la croissance [86]. Au moment où les cellules sont capables de déterminer la rigidité du milieu extracellulaire, elles répondent efficacement pour s'adapter. C'est le cas, par exemple, du remodelage des réseaux extracellulaires protéiques. D'un point de vue de la transduction cellulaire, le processus de détection de la rigidité peut être très rapide, complexe, et avoir des effets à différents niveaux. Ces détails ne sont pas explicités dans cette revue de littérature. Pour que les cellules puissent évaluer l'état de la rigidité externe, elles doivent activement pousser sur la matrice et imprimer une force spécifique pour pouvoir faire un déplacement [60]. De manière générale, la rigidité des tissus du corps dépend de la rigidité de la matrice extracellulaire mais également de la rigidité des cellules impliquées. Cependant, les études *in vitro* pour le développement de matériaux synthétiques se sont concentrées sur la rigidité de la matrice extracellulaire. Comme on l'a déjà mentionné, des études ont révélé la relation existante entre les propriétés mécaniques d'un substrat synthétique (comme le PET) et le comportement cellulaire [87]. Néanmoins, la raison pour laquelle la rigidité du substrat peut modifier la réponse cellulaire à long terme n'est pas encore totalement claire [86]. Une chose certaine est la possibilité pour les cellules inoculées sur un substrat synthétique de construire leur propre matrice extracellulaire, et que les propriétés physiques de cette matrice dépendront de la rigidité du substrat. Au final, les cellules répondront à l'influence de la nouvelle structure qu'elles ont elles-mêmes créée [88].

La géométrie du substrat influence aussi le processus d'adhérence des cellules. Chen et al. [89] ont produit des substrats aux géométries bien définis et des surfaces revêtues de molécules de la matrice extracellulaire. Ils ont créé des points d'adhésion sur chaque substrat, avec des

distributions et des distances différentes entre eux, mais conservant la région totale d'adhésion cellulaire. Il était possible d'y trouver un grand point d'adhésion, ou de petits points qui ensemble généraient la même zone d'adhésion. Ils ont ainsi trouvé que la morphologie cellulaire variait avec la géométrie du contact, et que même si la force totale d'adhésion était sensiblement la même, le comportement cellulaire global dépendait de la géométrie et de la taille des points d'adhésion. Ils ont également conclu qu'il y existait une zone minimale pour que les cellules adhèrent et arrivent à vivre, et que celle-ci pouvait être distribuée en petits points d'adhésion afin de favoriser l'adhésion cellulaire.

CHAPITRE 2. OBJECTIF, HYPOTHÈSE ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE DE L'ÉTUDE

2.1 Objectif

L'objectif principal de ce projet est d'étudier l'adhérence de cellules endothéliales inoculées sur des structures nanométriques de PET, sous des conditions physiologiques dynamiques.

2.2 Hypothèse

La topologie de matériaux non-tissés, fabriqués par la technique d'électrofilage, favorise l'adhésion des cellules endothéliales en conditions dynamiques.

2.3 Méthodologie

Pour atteindre cet objectif, nous avons employé la stratégie suivante :

2.4 Culture cellulaire

Les cultures cellulaires sur les surfaces contrôles et les surfaces tests ont été systématiquement effectuées en parallèle. Chaque test a été développé en deux étapes : une étape statique de 48 h suivie d'une étape dynamique de 20 min, 6 h ou 12 h. La plage d'intensité du cisaillement imposé a été sélectionnée afin de travailler dans une plage physiologique (5, 12 et 26 dyn cm⁻²). Tous les tests ont été exécutés en triplicatas identiques.

2.5 Évaluation des résultats

Les surfaces contrôles et les surfaces tests ont été fixées au formaldéhyde 3.7% après chaque test. Des techniques de coloration spécifiques de certaines molécules (actine et cadhérine vasculaire) ont été utilisées afin d'évaluer les changements de morphologie cellulaire avec le temps, et sous

différentes conditions de cisaillement. Les analyses de résultats ont été effectuées par microscopie à fluorescence et microscopie électronique SEM (Scanning Electron Microscopy).

2.6 Interprétation des résultats

Les données obtenues ont servi à décrire le comportement de cellules endothéliales (HAoEC) inoculées sur des surfaces nanométriques de PET et soumises à des conditions dynamiques de cisaillement.

CHAPITRE 3. ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE CELLULES ENDOTHÉLIALES DE L'AORTE, CULTIVÉES SUR DES FIBRES ÉLECTROFILÉES DE PET, SOUS CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES DE CISAILLEMENT

3.1 Présentation de l'article

Ce chapitre correspond au manuscrit scientifique qui a été soumis à la revue *Journal of Biomedical Nanotechnology*. Ce manuscrit inclut la méthodologie appliquée pour le développement de la culture cellulaire en conditions statiques et dynamiques et les résultats du comportement cellulaire obtenus après les tests. Une discussion détaillée et une conclusion seront aussi présentées.

L'adhérence de cellules endothéliales de l'aorte (Human Aortic Endothelial Cells HAoEC), qui ont été inoculées sur des surfaces non-tissées de PET, a été caractérisée. Les cellules ont été inoculées pendant 48 h sous conditions statiques et transférées dans une chambre de culture permettant l'application d'un flux unidirectionnel contrôlé. Des tests de courte (20 min) et longue durée (6 et 12 h) ont été effectués sous conditions physiologiques de cisaillement (5, 12 et 26 dyn cm^{-2}). La morphologie cellulaire et la réorganisation du cytosquelette ont été observées par microscopie électronique et à fluorescence. Les résultats obtenus suggèrent que les cellules endothéliales peuvent adhérer sur les surfaces de PET, et demeurer viables et attachées après 20 min sous la plage de cisaillement établie (5, 12 et 26 dyn cm^{-2}). Cependant, les cellules se détachent sous conditions extrêmes (26 dyn cm^{-2}) après un long temps d'exposition, montrant un pourcentage de rétention de 65% après 6 h et 30% après 12 h. Après 6 h, les résultats montrent des réarrangements du cytosquelette cellulaire et une discontinuité dans la distribution de la cadhérine vasculaire (VE-cadherin). Après 12 h, les résultats sont caractérisés par une distribution cellulaire anisotrope, des contractions du cytosquelette cellulaire, et une faible expression de la VE-cadherin. Ces données, confirment l'utilisation potentielle des fibres non-tissées de PET pour la fabrication de greffons vasculaires de petit diamètre.

3.2 Article : HUMAN AORTIC ENDOTHELIAL CELL BEHAVIOUR ON ELECTROSPUN POLYETHYLENE TEREPHTHALATE MATS UNDER SHEAR FLOW CONDITIONS

3.2.1 Authors

Claudia Torres¹, Abdellah Ajji, Mario Jolicoeur^{1,*}

¹ Canada Research Chair in Applied Metabolic Engineering, Bio-P² Research Unit, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montreal, P.O. Box 6079, Station Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

3.2.2 Keywords

Shear stress, electrospinning, PET, endothelial cells, small diameter vascular grafts, biomaterials.

3.2.3 Abstract

The adherence of human aortic endothelial cells (HAoEC) cultured on a non-woven PET (polyethylene terephthalate) nano-structure generated by electrospinning has been characterized. The cells were cultured for 48 h under static conditions on PET mats, and then transferred to a parallel plate flow chamber to impose controlled unidirectional hemodynamic shear stress conditions. Short (20min) and long-term assays (6 and 12 h) were performed at low and high physiological shear stress levels (5, 12 and 26 dyn cm⁻²). Cell morphology, cytoskeletal reorganization and adherent junctions were observed by SEM and fluorescent microscopy. This study suggests that HAoECs can adhere on PET mats, presenting isotropic spreading onto the PET mats, and remain viable and attached after 20 min under the shear stress range assessed (5, 12 and 26 dyn cm⁻²). However, cells detached at high shear stress (26 dyn cm⁻²) after a long-term exposure with ~65% of cell retention after 6 h and ~30% after 12 h. After 6 h, a finger-like shape and VE-cadherin distribution discontinuity was observed, while prolonging the exposure to 12 h resulted in an anisotropic cell distribution, the retraction of the cell cytoskeleton, in addition to a lower and more diffused expression of VE-cadherin. These findings confirm the potential of using non-woven PET nano structures in the construction of small diameter vascular grafts.

3.2.4 Introduction

Autologous native vessels bypass remains the standard medical approach for vascular replacements because of its physiological properties [1]. However, these replacements present a failure rate of 35%, and a high number of patients are lacking adequate vessels to allow autologous transplants, due to previous diseases, surgeries or size mismatch. Furthermore, even in cases of good clinical responses of autologous replacement, atherosclerotic events and intimal hyperplasia are unfortunately often observed over time [1], [2]. In complement to autologous transplant and in order to solve the above-mentioned problems, synthetic polymeric arteries have been developed and have now been used for more than 50 years [1]. Vascular grafts have to fulfill specific requirements to be biocompatible to the long term, such as being non-thrombogenic, non-inflammatory and non-immunogenic. Such grafts have also to accommodate pressure variations and thus possess a sufficient mechanical strength while complying with elasticity requirements to support pulsatile viscoelastic flow that occur in arteries and especially in blood vessels of small diameter. However, compliance mismatch often limits the success of the graft and it is usually accompanied by misalignment of smooth muscles cells (SMC), and poor presence of ECM (Extracellular Matrix). In particular, there are special compliance constraints to consider while developing small diameter artificial implants and vascular tissues, such as to allow endothelial cell (EC) growth on the luminal side and vascular SMCs (VSMC) on the abluminal surface [3]. EC-SMC interactions are crucial in the modulation process of VSMC phenotype at the maturation stage, which will determine as well the ability of the new structure to emulate the function of native vessels [4], [5]. In particular, VSMCs control vasoactivity by generating contractile forces, and these are stimulated by signals that are emitted by EC [4]. In order to enhance the biocompatibility of biomaterials and to extend the life of a graft *in vivo*, the graft basal structure characteristics can be enhanced using mats of fibers [6]. In a mat, pore-size, pore-density as well as fibers alignment and diameter, which are perceived as the most significant design parameters affecting its mechanical properties and influencing ECs and VSMCs attachment and coverage [3], can be controlled. A porous inner surface is important to anchor the endothelium, while a porous outer surface stimulates the infiltration of SMCs [7]. Controlled porosity and interconnected pores enhance cell growth, vascularization, and EC-SMC communication [8]. Cell migration is limited if the pores are not linked and the final mechanical

properties of the structure, after graft colonization by EC and SMC cells, can be compromised [9], [10]. The mat physical configuration, in addition to its chemical composition is, thus, critical for acting as native-like ECM where tissue regeneration is initiated and distribution of nutrients and metabolites can proceed as expected [11], but while avoiding posterior blood leakage [12]. An interesting approach would be to endothelialize the luminal surface of a graft prior to the surgery, a step that can prevent risks of thrombosis and diminish intimal hyperplasia [13]. Furthermore, strong EC attachment is required to prevent cell damage and apoptosis due to mechanical shear stress from graft manipulation and that from the blood flow. However, shear stress variations can affect EC shape, function and elastic properties [14], as well as cell cytoskeleton pattern, including actin fibers orientation and cell-cell junctions. The laminar shear stress, resulting from pulsatile or steady flows, can also influence the release of secondary messengers, resulting in the elongation and orientation of EC at specific locations [15], [16], [17]. Nevertheless, the mechanisms leading to structural change of cytoskeletal filaments still have to be described.

Among various methods to obtain polymer fibers for vascular graft development, electrospinning is a technique gaining in interest because it allows obtaining fibers of diameters that are similar to ECM (micrometers) down to few nanometers, which can be either randomly oriented or aligned into a non-woven scaffold. The result is a tissue that mimics blood vessels, with linked fibers and pores facilitating the distribution of biochemical signals [11]. In a previous work, different nonwoven PET structures were developed and tested for their biocompatibility with human brain endothelial cells (HBECs) and human aorta smooth muscle cells (HAoSMC) [3], [18]. PET has been widely used in the fabrication of vascular graft of large-caliber due to its excellent mechanical properties and biostability [1], as well as its ability to be processed into fibrous structures [6], [19], [20]. In Hadjizadeh et al., we have reported that the PET structure made of the smallest fiber diameter and pore size distribution favored cell adhesion and growth under static condition. The present study aims to evaluate the performance under physiological shear stress conditions of the most promising non-woven PET mat previously identified, as a potential material for small-caliber vascular graft. HAoEC morphology and adhesion, actin fibers distribution and adherent junctions were observed following the imposition of various physiological shear stresses.

3.2.5 Materials and methods

3.2.5.1 Cell preparation

Culture medium was prepared by mixing a bottle (500 ml) of Endothelial Cell Growth Medium MV (Cat. # C-22020, Promocell, Heidelberg, Germany), one vial (27.2 ml) of SupplementMix (Cat. # C-39225, Promocell) and 5 ml of penicillin/streptomycin (Cat. # 15140-122, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, US). 750 μ l of 5% fetal bovine serum (FBS, Cat. # F1051, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and 15 ml of culture medium were then mixed in a polystyrene culture flask (T-flask, 75 cm²) (Cat. # 3290; Corning® CellBIND®), and the flask was placed in a incubator (37 °C and 5% CO₂) for 30 min. Next, a cryopreserved Human Aortic Endothelial Cell (HAoEC) vial (Cat. # C-12271, Promocell) was thawed and the cells were immediately incorporated to the flask with the prewarmed medium. The cells were incubated until reaching confluence (4 to 5 days), then harvested and subcultured for posterior assays.

3.2.5.2 Non-woven PET structures

Various non-woven PET structures were designed and characterized in a previous work [19], where details of the electrospinning process used for the generation of the fibers and the construction of the mats are specified. Briefly, the polymeric solution was prepared by dissolving pellets of PET (PET selar® PT 7086, intrinsic viscosity of 1 dL/g, DuPont Co) into dichloromethane (DCM, CH₂Cl₂) and trifluoroacetic acid (TFA) (1:1) and constantly agitating for 24 h. The electrospinning set up includes a syringe pump (PHD 4400, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, United States), a high voltage power supply (Gamma Inc., Ormond Beach, Florida, United States), a glass syringe (1 and 5 ml) connected to a stainless steel needle gauge and a rotating collector (15 cm diameter, 35 cm length). Tissues of mat A1 [19], which was previously identified as having the most promising pore and fiber diameter characteristics, were selected from two different electrospinning batches (Table 3.1), and subsequently analyzed by XPS. The XPS spectra were acquired from a VG ESCALAB 3 MKII apparatus (Thermo

Scientific, Asheville, North Carolina, US) using Mg K_{α} radiation from an anode operated at 216W (12kV, 18 mA). The analysed area dimension was 2 mm x 3 mm. Survey spectra were recorded at a pass energy of 100 eV with 1 eV step size. For high resolution scans, the elements of interest were recorded at a pass energy of 20 eV with a 0.05 eV step size. Spectra were corrected for mat charging with respect to C1s at 285.0 eV. Peak fitting was performed using Thermo Advantage v4.75 (Thermo Scientific).

Table 3-1 : Physical characteristics of the non-woven PET structure A1

Average fiber diameter (μm)	Pore area (μm^2)			Pore size (μm)		
	Average \pm SD	Max.	Min.	Average \pm SD	Max.	Min.
0.74 ± 0.2	2.5 ± 1.6	10.4	0.2	1.8 ± 0.65	5.8	0.9

3.2.5.3 Shear-stress assay chamber

The shear stress assay chamber and experimental set up are both shown in Figure 3-1. The system includes a peristaltic pump (Masterflex 7520-50 console drive, 77202-60 heads, Cole-Parmer, Montreal, Quebec, Canada), silicone peroxide cured tubing of 1.42 mm ID (Cat. # RK07625-34, Cole-Parmer), silicone platinum cured tubing L/S 16 (Cat. # RK-96410-16, Cole-Parmer), a parallel plate flow chamber (Cat. # 31-001, Glycotech, Gaithersburg, Maryland, US), and a 125 mL reservoir. The system was placed inside a laminar hood and the temperature was controlled at 37°C by a stirring hotplate (Cat. # Z110957, Sigma-Aldrich).

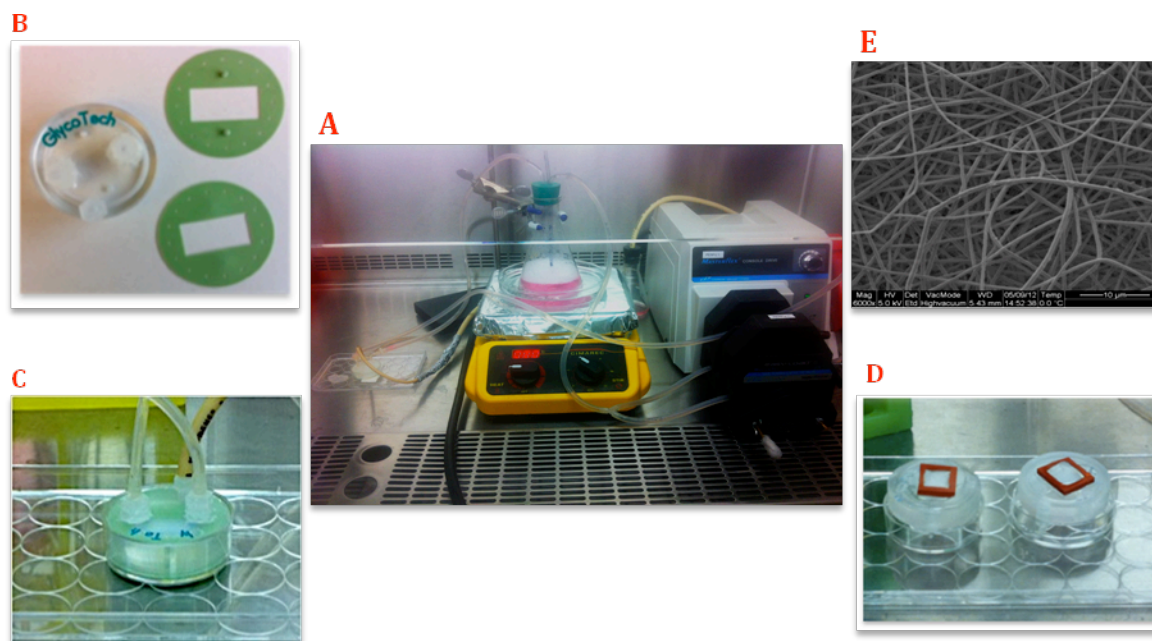


Figure 3-1 : Shear stress assay chamber and experimental set up (A). Parallel plate flow chamber parts (B). Parallel plate flow chamber assembled (C). Static inoculation on a non-woven PET structure previously fixed on the parallel plate flow chamber (D). SEM image of the non-woven PET mat (nano-surface A1) (E).

The parallel plate flow chamber (Fig. 3-1(B)) is made of a cast acrylic deck (head of the chamber), two circular silicone rubber gaskets (Cat. # 31-005, Glycotech), whose width (1 cm) and thickness (0.0254 cm) define the dimensions of the flow path, and a polystyrene dish (cat. # 08-772-20, Corning® cell culture treated, Fisher Scientific Inc., Montreal, Quebec, Canada) that acts as the bottom of the chamber. The deck top has a flow inlet, a flow outlet, and a connection for vacuum that enables to seal and hold the system together. To assemble the chamber (Fig. 3-1(C)), the silicone gaskets have to be placed between the deck and the Petri dish and they must be well aligned to ensure reproducible and expected dimensions inside the chamber, and as a result, to impose the expected flow rate.

3.2.5.4 Cell seeding

Each assay was performed using two decks: one as control and one for the assay (Fig. 3-1(D)). First, two mats (structure A1) (control and test surface) were cut (11 mm x 8 mm), placed in polystyrene tissue culture treated 24-well plates (TPP, Cat. # 92024, Trasadingen, Switzerland), sterilized in 500 μ l of denatured ethanol (70%, in Milli-Q water) for 1h, and after ethanol removal, let open under the laminar hood overnight for drying. The day after, handling the decks inverted (with the inlet and outlet downside), the mats were fixed onto the deck surface at the middle area, using a minimal quantity of a biocompatible silicone glue (Cat. # MED-1356, Nusil Silicone Technology, Carpinteria, California, US). Next, perforated press-to-seal silicone isolators (2.5 mm x 12 mm x 9 mm) (Cat. S5560, Sigma-Aldrich) were fixed on the decks, surrounding the PET mats. This delimited area allowed to restrain cell seeding (400 μ l) onto the mat (Fig 3-1(D)). HAoEC undergoing three to six passages, cultured in T-flasks (75 cm²), were rinsed two times with 5 ml DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, Cat. # 21600-069, Invitrogen Corporation). Then, 3 ml of trypsin/EDTA (Cat. # C-41010, Promocell) were added to the flask and incubated for 5 min. The resulting cell suspension was collected in a 50 ml FalconTM Conical Centrifuge Tube (Cat. # 21008-951, VWR, Radnor, Pennsylvania, US) containing 500 μ l of FBS. The flask was rinsed with 10 ml of culture medium, which was subsequently added to the Falcon* tube, and then centrifuged for 5 min at 188 g (1000 RPM). The supernatant was removed and the cells were resuspended in 1-2 ml of prewarmed culture medium. A 100 μ l sample of the cell suspension was stained with Trypan Blue for the determination of cell viability using a hemocytometer. Next, cells were seeded on the PET mats at a cell density of 1×10^6 cells cm⁻² and let for 48 h for cell adherence, in Magenta vessels (Cat. # V8505, Sigma-Aldrich) in an incubator (37°C, 5% CO₂). Then, the chamber and the closed system were assembled and filled with Complete Endothelial Cell Growth Medium avoiding the entrapment of any gas bubbles. The control sample was left in the incubator during the time of the dynamic assay.

3.2.5.5 Shear stress assays

Experimental flow rates (Q) were calculated using equation (1), after establishing the physiological shear stress forces (τ) to be imposed inside the chamber (5, 12 and 26 dyn cm⁻²), based on literature [21]. W and h correspond respectively to the width and the thickness of the silicone gaskets delimiting the flow path inside the parallel chamber, and λ is the apparent viscosity of the culture medium. All assays were performed in triplicate, at different times.

$$Q = \frac{\tau W h^2}{6\lambda} \quad (1)$$

A series of assays were performed with shear stress imposition at short (20 min) and long terms. Prior to shear stress loading, all assays included a 48 h culture under static condition inside the incubator, to allow cell adaptation to the PET surface and their growth to confluence. Three short-term (20 min) assays were conducted at 5, 12, and 26 dyn cm⁻². The two long-term assays were performed at 26 dyn cm⁻², for 6 and 12 h.

3.2.5.6 Cell behavior monitoring

After each shear stress assay, PET mats were carefully removed and placed in a polystyrene tissue culture treated 24-well plate. The mats were gently washed with PBS two times, and then the cells were fixed by using a formaldehyde solution (3.7% v/v in PBS) for 15 min. Then, the mats were washed twice with PBS. Following short-term assays, SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Cat. # S7020, Invitrogen) was added (0.01% v/v in PBS; 300 µl per well in a 24-wellplate). The mats were let at dark for 30 min incubation and then washed two times with PBS for microscope observations.

After long-term assays, actin fibers were stained using rhodamine phalloidin (Cat. # R415, Molecular Probes®, Invitrogen), and immunostaining with anti-VE-Cadherin (Cat. # CD144,

Sigma-Aldrich) was performed to evaluate cell junctions, both as described in the following. After the cell fixation step described above, the mats were cut into two pieces. Piece 1 was permeabilized with Triton X-100 (0.5% v/v in PBS) for 5 min, washed (3 times) with PBS, and then incubated in a blocking buffer solution (10% bovine serum albumin (BSA) in PBS) for 1 h. After washing (3 times), rhodamine phalloidin (2.5% v/v in BSA; 300 µl per well in a 24-wellplate) was added, and the mats were placed in dark incubation for 30 min. Then, the mats were washed two times and let aside (immersed in PBS), for subsequent observations. Piece 2 was incubated in 10% BSA for 1 h, and then anti VE-Cadherin (1:100 dilution in BSA, 300 µl per well in a 24-wellplate) was added. The mat was incubated for 1 h at room temperature. After washing (3 times), Alexa FluorTM 488 donkey anti-rabbit (Cat. # A-21206, Invitrogen) (0.5% v/v in BSA; 300 µl per well in a 24-wellplate) was added and the mat was incubated for 1 h in the dark. Finally, the mat was washed (3 times) with PBS. All the mats were kept in PBS solution to avoid dehydration.

Cell confluence, cytoskeleton and cell-cell junctions were observed using a fluorescent microscope (Axio Observer Z1; Carl Zeiss, North York, Ontario, Canada) equipped with a digital CCD camera and imaging software (AxioVision, Carl Zeiss). Images of cell shape and morphology were taken by SEM (ESEM, Quanta 200 FEG, FEI Company, Hillsboro, Oregon, US) with a high vacuum mode observation (accelerating voltage = 5 kV; spot size = 3 and working distance ~5 mm). The specimens were sputter-coated with gold (Agar Manual Sputter Coater, Marivac Inc., Lakefield, Quebec, Canada).

3.2.6 Results

In a previous work, as mentioned earlier, our group demonstrated that a PET mat with fibers of 740 nm diameter generated by electrospinning (nano-surface A1) allows endothelial cell adhesion and growth under static culture conditions [18]. The aim of the present work was thus to study endothelial cell response grown on a PET mat, but submitted to a wide range of physiological hydrodynamic shear stress. A continuous laminar flow was generated conducting short and long-term experiments. Changes in cell shape, cytoskeleton and cell-cell junctions were monitored prior and following the assay. All assays were performed in triplicate.

3.2.6.1 Short-term hydrodynamic shear stress

As a first approach, short-term experiments (20 min) were performed. Low-to-high shear stress conditions, within the physiological range of 5, 12 and 26 dyn cm⁻² were tested. For each experiment, two PET mats were inoculated with HAoEC at 10⁶ cells cm⁻², with one mat as control under static conditions and one for the shear stress assay. A period of 48 h was allowed for cell adherence on PET mats under static conditions. The cells underwent isotropic spreading and the inoculum density enabled to reach confluence (~100%) after the 48 h adhesion/growth time period. Interestingly, no noticeable cell detachment has been observed following the imposition of a shear stress for 20 min (Fig. 3-2), at any shear stress levels assessed. The cells flattened onto the mat surface, maintaining a state of nearly confluence, for the three shear stress conditions, similarly to the control structure.

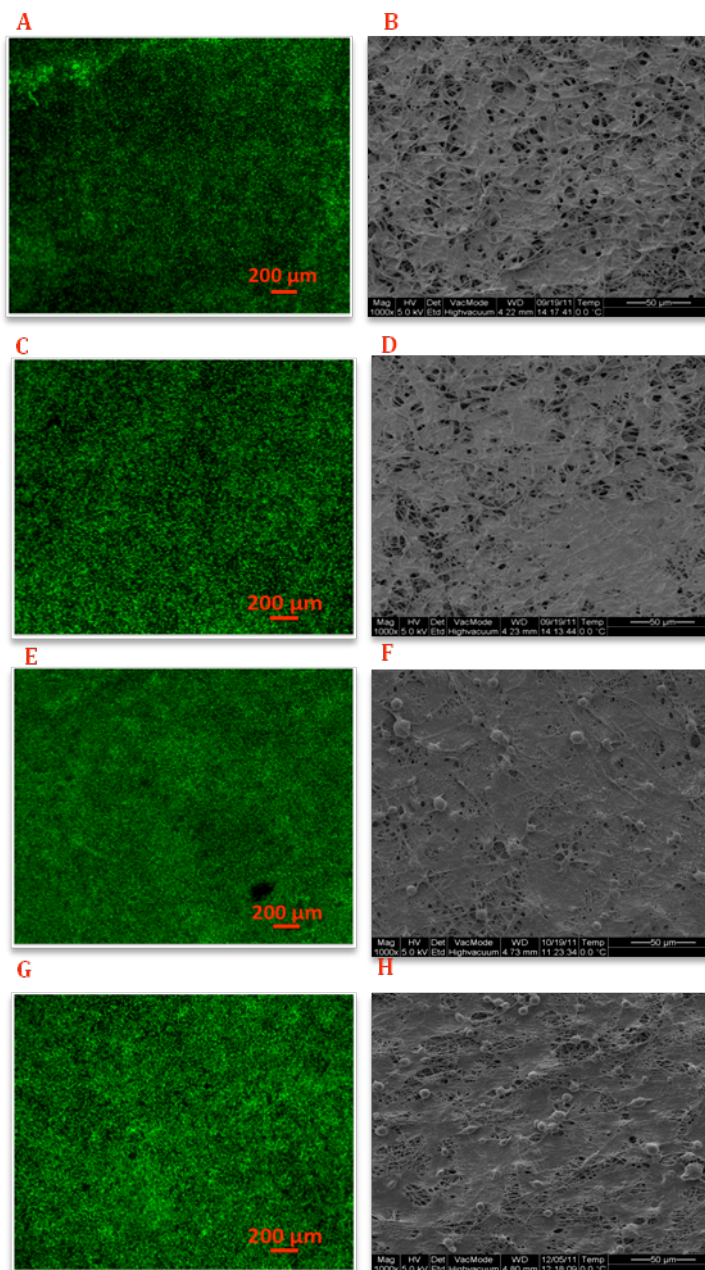


Figure 3-2 : Short-term (20 min) hydrodynamic shear stress assays. Fluorescent microscopy 5X (A, C, E, G). SEM (B, D, F, H). A and B control surfaces (static conditions). Test surfaces (dynamic conditions, from C to H) exposed 20 minutes under shear stress. C and D at 5 dyn cm⁻². E and F at 12 dyn cm⁻². G and H at 26 dyn cm⁻².

3.2.6.2 Long-term hydrodynamic shear stress

Long-term experiments were also initiated with a period of 48 h under static conditions. Two shear stress assays were performed in triplicate for durations of 6 and 12 h. A hydrodynamic shear stress of 26 dyn cm^{-2} for 6 h resulted in a $\sim 35\%$ decrease of the mat surface cell coverage, compared to the control (Fig. 3-3).

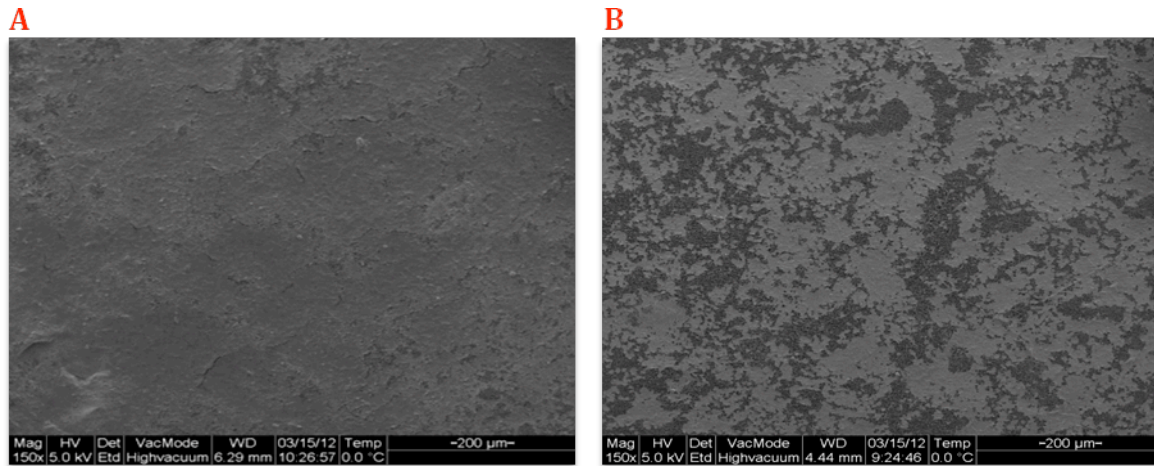


Figure 3-3 : Tissue integrity after a 6h hydrodynamic shear stress assay. Control surface (A) evaluated under static conditions. Test surface (B) evaluated at 26 dyn cm^{-2} for 6 hours.

However, cells seemed to detach by large plaques. Precise fluorescent images showing the details of cell junctions and actin filaments were difficult to obtain due to the opacity of the PET fibers. Therefore, a cell culture on polystyrene plates (Fig. 3-4(A)) was also conducted in parallel with the purpose of confirming the staining results in the test culture. The control surface (Fig. 3-4(B)) exhibits round cell shape with points of early cell-cell contacts with a discreet VE-cadherin staining at the cell periphery. The shear stressed culture shows a higher level of VE-cadherin (compared to the control mat) with, however, clear signs of discontinuity (Fig. 3-4(C)) and areas of intercellular gaps, as shown by the red arrows.

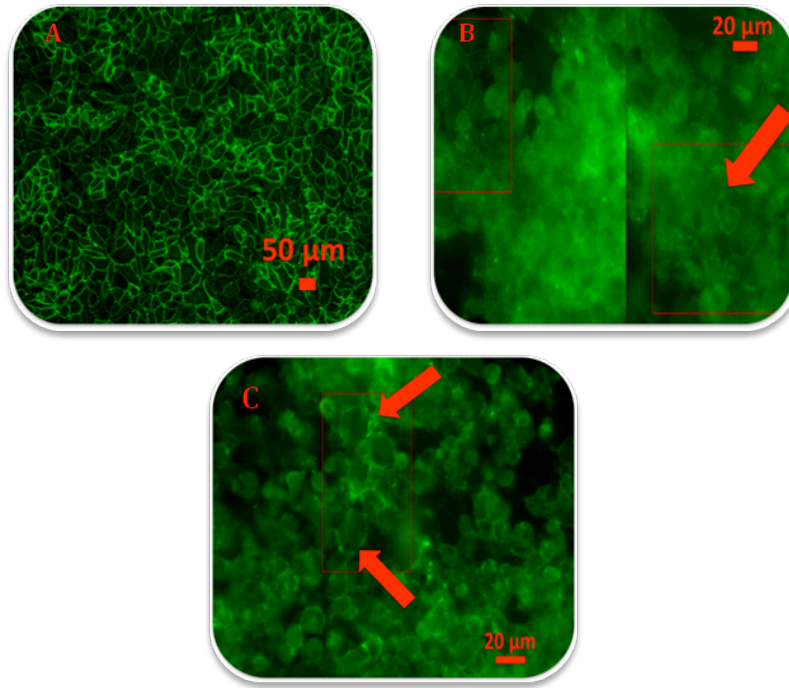


Figure 3-4 : Cell junctions revealed by VE-cadherin staining after a 6h hydrodynamic shear stress assay. Cells directly seeded under static conditions on a tissue culture plate for 48 h (A). Control surface: cells inoculated under static conditions on a non-woven PET surface (B). PET mat after a 6 h assay (post 48 h under static conditions) at 26 dyn cm^{-2} (C).

Staining of cell cytoskeleton for the control surface shows the presence of thick actin fibers, which were slightly more concentrated at the cell periphery but without any clear sign of fibers alignment (Fig. 3-5(A)). Supplemental assays were conducted by seeding cells in standard polystyrene culture plates, without a PET mat, and allowed to confirm our observations with a better image precision than when using a PET mat because of fibers optical interference (Fig. 3-5(B)). In contrast, cells that adhered to the test surface show a different arrangement with actin fibers in a finger-like shape (Fig 3-5(C)), as shown by the green arrow. After a 6 h stress, cells did not display a significant order or pattern but there was a redistribution of the short actin fibers in a non-specific manner throughout the cell body.

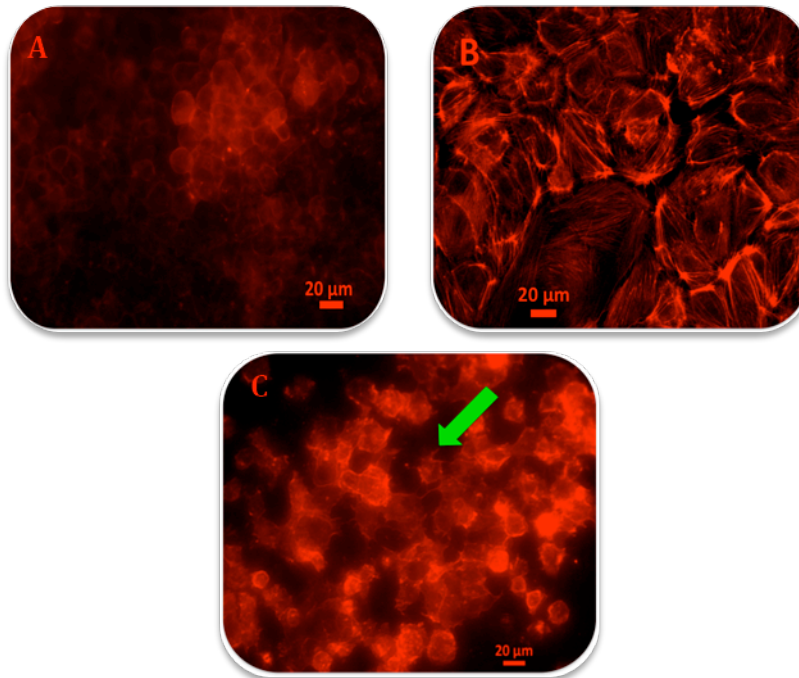


Figure 3-5 : Actin fibers after a 6 h hydrodynamic shear stress assay. Control surface: Cells inoculated under static conditions on a non-woven PET surface (A). Cells directly seeded under static conditions on a tissue culture plate for 48 h (B). Test sample after 6 h (post 48 h under static conditions) at 26 dyn cm^{-2} (C).

Finally, the effect of a prolonged stress for 12 h (26 dyn cm^{-2}) has further affected the cells. Cell retention dropped to only $\sim 30\%$ (Fig. 3-6).

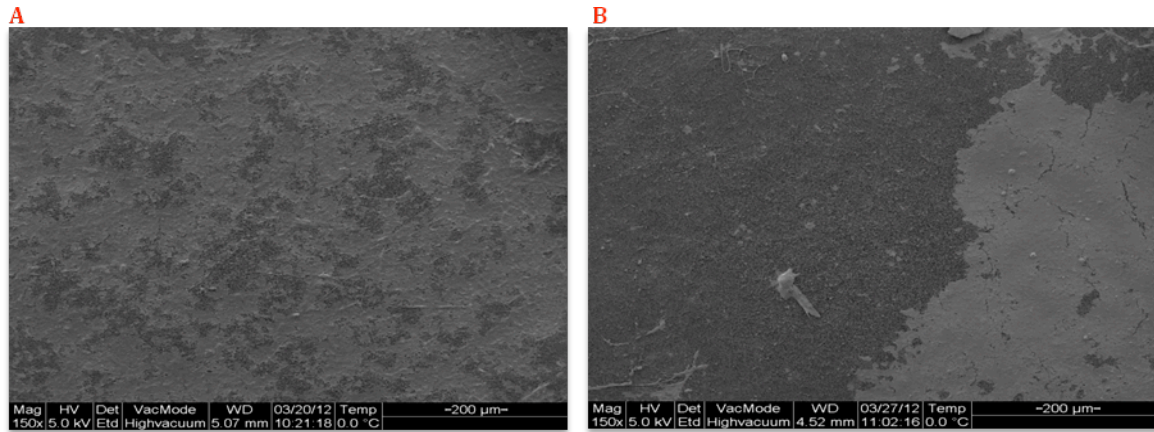


Figure 3-6 : Tissue integrity after a 12 h hydrodynamic shear stress assay. Control surface (A) evaluated under static conditions. Test surface (B) evaluated at 26 dyn cm^{-2} for 12 h.

Even though the cells expressed VE-cadherin, the staining was weak and not continued at the cell periphery (Fig. 3-7(A) right). Large cell plaques showed to detach from the mat surface (Fig. 3-6(B) and this phenomenon was accompanied with a change in cell shape and cytoskeletal organization (Fig. 3-7(B) and (C)). Cells, which still showed an isotropic distribution after 20 min of stress imposition, exhibited an anisotropic distribution after 12 h (Fig. 3-8(A) and (B)). Some cells exhibit a contractile retraction, recovering a round (protrusion-like) structure (Fig. 3-8(C)), suggesting a reduction of their contact area with the mat surface. On the contrary, other cells on the same mat adopted a polarized shape with actin fibers highly elongated in the direction of cell stretch, and probably aligned with the shear flow (Fig. 3-8(C)).

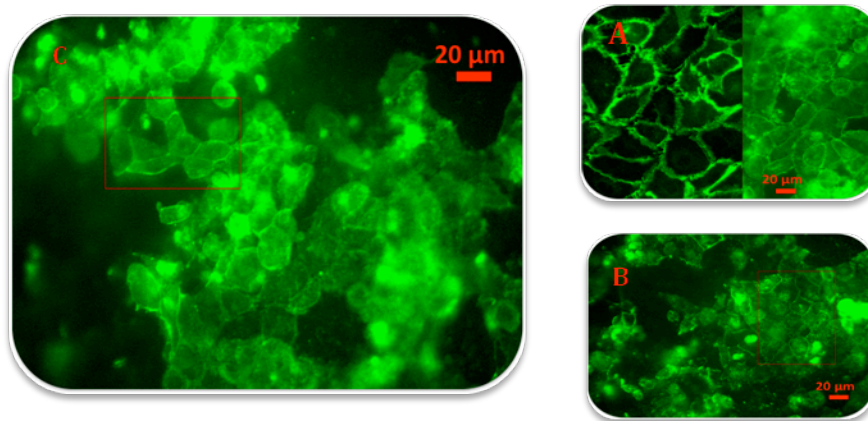


Figure 3-7 : Cell junctions revealed by VE-cadherin staining after a 12-hour-test. Cells seeded directly on a tissue culture plate under static conditions (left) vs. test sample at 26 dyn cm^{-2} (right) after 12 h of inoculation (A). Other VE-cadherin images obtained after 12 h of flow at 26 dyn cm^{-2} (B) and (C).

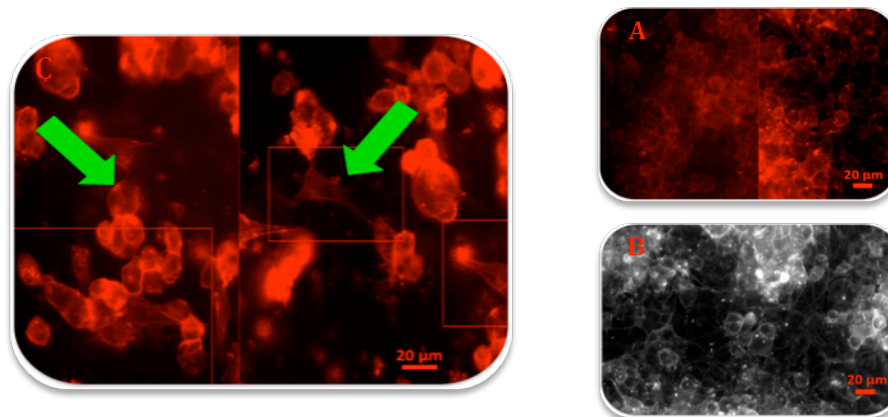


Figure 3-8 : Actin fibers after a 12 h hydrodynamic shear stress test. Control surface seeded on PET (left) vs. test surface (right) at 26 dyn cm^{-2} for 12 h (A). White and black image of the actin fibers after 12 h under flow (B). Cell cytoskeleton after 12 h at 26 dyn cm^{-2} (C).

3.2.7 Discussion

ECs are naturally programmed to adhere on a biocompatible surface and to form a leak-tight monolayer, when appropriate signals are present. Cell adhesion is mediated by transmembrane receptors and extracellular matrix proteins where integrins bridge the ECM to adherent junctions, including actin and cadherin, resulting in the assembly of focal adhesion points [22]. The generation of these adherence bonds is a complex process that is conditioned not only by biochemical factors but also by the geometry and the elasticity of the mat [23]. In our case, the cell monolayer on the PET surface can be seen as an elastic structure, where the elasticities of the cell monolayer and of the mat evolve, as a result of the contractile internal forces caused by the constant polymerization and depolymerization processes of stress fibers network [23]. This mechanical balance is among the prominent factors governing cell size and shape, maintaining the equilibrium between the cytoskeleton and the cell membrane to preclude cell collapsing phenomenon [24]. It has been shown that external mechanical forces such as shear stress act on proteins associated with cell junctions, affecting cell function and morphology [25]. When a cell senses these mechanical forces, the conformational structure of these proteins changes, exposing interaction sites that can intervene in signaling cascades [26]. This signal transduction is crucial to activate the adequate atheroprotective function of the endothelium, which is determined by cellular processes such as cell cytoskeletal organization, cell adhesion, migration, growth, differentiation, and apoptosis [27].

In vitro studies have been performed to understand the morphological changes that characterize *in vivo* atheroprone and atheroprotective endothelial cell behavior [31], [32], [38], [39]. Since the topology of micro and nano-structures of a biomaterial are known to affect cell response and the level of cell adhesion to mechanical stimulus [28], [38] we have focused in this work at studying the intrinsic ability of PET, processed by electrospinning as a mat of nano-scale fibers, to favor the ability of HAoEC to adhere and maintain a healthy tissue. The modified parallel plate flow chamber used here allowed to impose well-defined shear stress forces on a confluent monolayer of HAoECs adhered to a PET mat, thus mimicking hemodynamic conditions of the vasculature in two-dimensions. Early cell-mat adhesion strength (i.e. 48 h under static conditions) was analyzed imposing a 20 min shear stress, and the cells showed to remain adhered (~100%) and stayed

viable (Fig. 3-2). Assays to evaluate the effect of 6 h of shear stress on the cell-mat adhesion strength clearly resulted in a decreased cell confluence with detachment of cells (~35%) in multicellular plaques (Fig. 3-3(B)). Two important observations were noticed: on the one hand, the occurrence of cytoskeleton reorganization characterized by finger-like cytoplasmic extensions and polygonal cell shapes (Fig. 3-5(C)) that we associated with the process of substratum sensing and the formation of the first focal adhesions points, and on the other hand, VE-cadherin distribution changes (Fig. 3-4(C)) probably due to mechanical signal transduction induced by the stretching force. These last results are in agreement with Miao et al. [30] who suggest VE-cadherin EC disruption after 6 h under pulsatile flow. Submitting adhered endothelial cells to steady or pulsatile flows for 6 h has been shown to induce intercellular gaps and the binding of VE-cadherin to cytoplasmic molecules such as the β -catenin protein at the cell periphery [17]. During this process, VE-cadherin expression changes constantly, as a result of surface recognition [29], reaching a sustained distribution after 24 h of exposure under a pulsatile flow [30], [17], when a new cell-cell stable contact is created [31].

Interestingly enough, after 12 h under a high hydrodynamic physiological shear stress of 26 dyn cm^{-2} , the cell layer did separate by large plaques (Fig. 3-6(B)) with a global cell detachment of ~70%. This result suggests that the cells did form strong cell-cell junctions, as indicated by VE-cadherin staining, but also that PET fibers surface and the mat topology did not favor the development of well-structured and strong focal adhesion points with an adequate bond lifetime. We consider that, at this point, the cell monolayer lost its synchronised movement as well as the equilibrium of the forces that act on each cell. However, some of the cells that remained adhered showed a noticeable morphological change; they were not polygonal as occurred after 6 h, but elongated and with longer actin fibers (Fig. 3-8(C)), which are both signs of a healthy endothelium [32], [33]. Similarly to our results, Rouleau et al. [39] found that morphological changes of the cells were dependent on the time of exposure under dynamic conditions. We associated this cell behavior to the maturation of the cell adhesion state, a response phenomenon to the primary sensor process [25]. Previous *in vitro* studies [31], [32] have also shown that elongated cell shapes in the direction of the flow are found in regions of laminar and straight flow, as a result of an atheroprotective EC response. This statement could explain the

morphological evolution of the evaluated cells trying to maintain a confluent and functional layer.

An extra 24 h-assay (data not shown) was performed in triplicate in a last attempt to allow more time for cell attachment and cell layer structuration on the PET surface under dynamic stressful flow at 26 dyn cm^{-2} . Interestingly, almost 100% of the cells showed to detach from the mat. This complementary result thus confirms that the PET nano-fibers do not offer complete adequate conditions to enable adhered cells to maintain an equilibrium between external and internal forces that together balance the dynamic adhesion-detachment process [34], a capacity that is vital for cell proliferation and viable morphological cell transformation. We consider that this equilibrium might have been affected by unsuitable and non-matured focal adhesions, probably characterized by insufficient transmembrane proteins, synthesized by the cells for their attachment with the PET surface. Balaban et al. [35] showed that the maturation level of focal adhesions is determinant for cell anchorage during the process of cell motility and recognition of the surface rigidity. When the cells attain strong cell-cell and cell-matrix junctions, they evaluate the rigidity of their environment pulling on the surface and changing their structure to respond appropriately [36]. However, when this force is too high, some focal adhesions might be compromised and then break, causing cell detachment. Additionally and in agreement with Feugier et al. [38] the morphology of the cells might have been influenced by the mechanical and physical characteristics of the polymeric structure. In our case the shape adopted by the evaluated cells, certainly influenced by the PET, did not allow them to resist to the force exerted by the shear stress. From our point of view, the distribution of the PET fibers might not be homogeneous enough to let each cell synthesize an adequate number of strong focal adhesions, with specific contact areas and geometries. This problem could have affected the synchronised movement that must characterized a confluent and healthy endothelium.

Our findings allow to have an approach to understand HAoEC adherence on the nano-PET fibers under conditions of flow. However, it is important to note that EC behavior might vary with the dimensions and conditions of the hydrodynamic system, since this type of shear stress flow chambers are highly sensitive to perturbations, as mention by Rouleau et al. [39]. One of the main requirements when replacing blood vessels of any diameter is to ensure the adherence of the

cells, condition that is of the uttermost importance for the success of any procedure. Because of that, we consider essential a 2D analysis step to evaluate improvements of cell adherence on the new nano-PET structures, before moving any further due to the fact that, adherence under these controlled conditions is imperative before trying to reflect live-conditions in 3D models.

3.2.8 Conclusion

In this work, we clearly showed that HAoEC adhere to a non-woven PET mat generated by electrospinning. Cell adherence was characterized under static and dynamic conditions, with signs of the formation of focal adhesion points and cell-cell functions, as revealed respectively by VE-cadherin and actin fibers networks staining. Consequently, and quite surprisingly, our results suggest that PET mats made by electrospinning represent a valuable bone-structural matrix for the development of small diameter vascular grafts. However, it is also clear from the large plaques of cells that detached under high hydrodynamical shear stress that such biomaterial requires surface functionalization to enable ECs adhesion to the long term, a prerequisite for its clinical use. Therefore, there are various promising avenues that can be applied, in further studies, such as the grafting of growth factors or the coating of fibers with another material promoting long-term cell adhesion [37] Additionally, more work has to be done at imposing pulsatile flow as well, to cope with *in vivo* conditions.

3.2.9 Acknowledgments

We wish to thank to Dr. Monica Nelea for her technical assistance with the SEM images. This project was funded by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and The Canada Research Chair Program.

3.2.10 References

1. J. Chlupac, E. Filova, L. Bacakova, Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery, *Physiol. Res.* 58, S119-S139 (2009).

2. S. Li, J.J.D. Henry, Nonthrombogenic Approaches to Cardiovascular Bioengineering, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13, 451-475 **(2011)**.
3. M.J. Moreno, A. Ajji, D. Mohebbi-Kalhari, M. Rukhlova, A. Hadjizadeh, M.N. Bureau, Development of a compliant and cytocompatible micro-fibrous polyethylene terephthalate vascular scaffold, *J. Biomed. Mater. Res. Part B.* 97B, 201-214 **(2011)**.
4. M.B. Chan-Park, J.Y. Shen, Y. Cao, Y. Xiong, Y. Liu, S. Rayatpisheh, G.C.-W. Kang, H.P. Greisler, Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 88A, 1104-1121 **(2009)**.
5. R.J. Powell, J.L. Cronenwett, M.F. Fillinger, R.J. Wagner, L.N. Sampson, Endothelial cell modulation of smooth muscle cell morphology and organizational growth pattern, *Ann. Vasc. Surg.* 10, 4-10 **(1996)**.
6. A. Hadjizadeh, A. Ajji, M.N. Bureau, Preparation and characterization of NaOH treated micro-fibrous polyethylene terephthalate nonwovens for biomedical application, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 3, 574-583 **(2010)**.
7. R.A. White, The effect of porosity and biomaterial on the healing and long-term mechanical properties of vascular prostheses, *ASAIO transactions / American Society for Artificial Internal Organs.* 34, 95-100 **(1988)**.
8. M.A. Contreras, W.C. Quist, F.W. LoGerfo, Effect of porosity on small-diameter vascular graft healing, *Microsurgery.* 20, 15-21 **(2000)**.
9. D.J. Mooney, D.F. Baldwin, N.P. Suh, L.P. Vacanti, R. Langer, Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents, *Biomaterials.* 17, 1417-1422 **(1996)**.
10. E. Carletti, A. Motta, C. Migliaresi, Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture, *Methods Mol. Biol.* 695, 17-39 **(2011)**.
11. S. Heydarkhan-Hagvall, K. Schenke-Layland, A.P. Dhanasopon, F. Rofail, H. Smith, B.M. Wu, R. Shemin, R.E. Beygui, W.R. MacLellan, Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering, *Biomaterials.* 29, 2907-2914 **(2008)**.

12. S. Venkatraman, F. Boey, L.L. Lao, Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired, *Prog. Polym. Sci.* 33, 853-874 **(2008)**.
13. A.E. Ensley, R.M. Nerem, D.E. Anderson, S.R. Hanson, M.T. Hinds, Fluid shear stress alters the hemostatic properties of endothelial outgrowth cells, *Tissue Eng. Part A*. 18, 127-136 **(2012)**.
14. O. Thoumine, T. Ziegler, P.R. Girard, R.M. Nerem, Elongation of confluent endothelial cells in culture: the importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure, *Exp. Cell Res.* 219, 427-441 **(1995)**.
15. C.F. Dewey, Jr., S.R. Bussolari, M.A. Gimbrone, Jr., P.F. Davies, The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress, *J. Biomech. Eng.* 103, 177-185 **(1981)**.
16. M.J. Levesque, R.M. Nerem, The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress, *J. Biomech. Eng.* 107, 341-347 **(1985)**.
17. J.J. Chiu, S. Chien, Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives, *Physiol. Rev.* 91, 327-387 **(2011)**.
18. A. Hadjizadeh, A. Ajji, M. Jolicœur, B. Liberelle, G. De Crescenzo, Fiber diameter, orientation and surface properties of electrospun polyethylene terephthalate fibrous mats influence HAOEC response, *J. Biomed. Nanotechnol.* **(2012)**. *In press*.
19. A. Hadjizadeh, A. Ajji, M.N. Bureau, Nano/micro electro-spun polyethylene terephthalate fibrous mat preparation and characterization, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4, 340-351 **(2011)**.
20. S. Dimitrievska, A. Petit, A. Ajji, M.N. Bureau, L. Yahia, Biocompatibility of novel polymer-apatite nanocomposite fibers, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 84, 44-53 **(2008)**.
21. H. Inoguchi, T. Tanaka, Y. Maehara, T. Matsuda, The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft, *Biomaterials*. 28, 486-495 **(2007)**.
22. E.A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, J.P. Spatz, Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands, *Biophys. J.* 92, 2964-2974 **(2007)**.

23. K. Kendall, Adhesion of cells, viruses and nanoparticles, Springer, New York **(2010)**.
24. M.A. Fardin, O.M. Rossier, P. Rangamani, P.D. Avigan, N.C. Gauthier, W. Vonnegut, A. Mathur, J. Hone, R. Iyengar, M.P. Sheetz, Cell spreading as a hydrodynamic process, *Soft Matter*. 6, 4788-4799 **(2010)**.
25. V. Vogel, M. Sheetz, Local force and geometry sensing regulate cell functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 265-275 **(2006)**.
26. Y. Sawada, M. Tamada, B.J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, M.P. Sheetz, Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas, *Cell*. 127, 1015-1026 **(2006)**.
27. B. Geiger, D. Ginsberg, The cytoplasmic domain of adherens-type junctions, *Cell Motil. Cytoskeleton*. 20, 1-6 **(1991)**.
28. W.J. Li, J.A. Cooper, Jr., R.L. Mauck, R.S. Tuan, Fabrication and characterization of six electrospun poly(alpha-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications, *Acta Biomater.* 2, 377-385 **(2006)**.
29. M.G. Lampugnani, M. Corada, L. Caveda, F. Breviario, O. Ayalon, B. Geiger, E. Dejana, The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), *J. Cell Biol.* 129, 203-217 **(1995)**.
30. H. Miao, Y.L. Hu, Y.T. Shiu, S. Yuan, Y. Zhao, R. Kaunas, Y. Wang, G. Jin, S. Usami, S. Chien, Effects of flow patterns on the localization and expression of VE-cadherin at vascular endothelial cell junctions: in vivo and in vitro investigations, *J. Vasc. Res.* 42, 77-89 **(2005)**.
31. O.F. Khan, M.V. Sefton, Endothelial cell behaviour within a microfluidic mimic of the flow channels of a modular tissue engineered construct, *Biomed. Microdevices*. 13, 69-87 **(2011)**.
32. J.J. Chiu, D.L. Wang, S. Chien, R. Skalak, S. Usami, Effects of disturbed flow on endothelial cells, *J. Biomech. Eng.* 120, 2-8 **(1998)**.

33. B. Imberti, D. Seliktar, R.M. Nerem, A. Remuzzi, The response of endothelial cells to fluid shear stress using a co-culture model of the arterial wall, *Endothelium-J. Endoth.* 9, 11-23 **(2002)**.
34. L. Rouleau, M. Farcas, I. Copland, J.C. Tardif, R. Mongrain, R.L. Leask, Morphological and Functional Flow-Induced Response of Endothelial Cells and Adhesive properties of Leukocytes in 3D Stenotic Models. 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering. 22, 2015-2018 **(2009)**.
35. N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, B. Geiger, Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates, *Nat. Cell Biol.* 3, 466-472 **(2001)**.
36. D.E. Discher, P. Janmey, Y.L. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science*. 310, 1139-1143 **(2005)**.
37. V. Vogel, G. Baneyx, The tissue engineering puzzle: A molecular perspective, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5, 441-463 **(2003)**.
38. P. Feugier, R.A. Black, J.A. Hunt, T.V. How, Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress, *Biomaterials*. 26, 1457-1466 **(2005)**.
39. L. Rouleau, M. Farcas, J. Tardif, R. Mongrain, R.L. Leask, Endothelial cell morphologic response to asymmetric stenosis hemodynamics: Effects of spatial wall shear stress gradients, *J. Biomech. Eng.* 132, 1-9 **(2010)**.

CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE

Tel que présenté précédemment, les options pour la transplantation de vaisseaux sanguins de petit diamètre sont encore limitées. Actuellement, une partie du génie tissulaire se concentre sur le développement de matériaux synthétiques biocompatibles qui permettent l'adaptation et la croissance cellulaire. Ces biomatériaux sont utilisés comme substrat où les cellules peuvent adhérer, croître et migrer, promouvant ainsi les fonctions physiologiques naturelles. Cependant le biomatériau parfait pour le développement des greffons synthétiques reste à être mis au point. Le PET a été un polymère de premier choix pendant plus de 50 ans [1], [29], [21]. Les résultats obtenus dans la fabrication des vaisseaux sanguins de grand diamètre montrent un taux de succès important (93% pour des remplacements aortiques) à court terme (5 ans) après la transplantation [30], [90]. Toutefois, une forme non-tissée, obtenue par l'application de la technique d'électrofilage représente une option prometteuse pour la nouvelle génération de biomatériaux [22], et la création de greffons biomimétiques qui répondraient aux besoins d'un transplant vasculaire à long terme, car ce type de biomatériau permet, de par son architecture éclatée, une diversité de possibilités quant à ses propriétés chimiques, physiques et topologiques. Désormais, le grand défi est de créer un substitut qui favoriserait la fonction cellulaire adéquate de l'endothélium, et par conséquent des muscles lisses, permettant une réponse mécanique appropriée face aux changements de conditions hémodynamiques du système réel.

Notre groupe de recherche travaille sur le développement de nouveaux tissus composés de fibres de PET non-tissés, obtenus par électrofilage, avec une porosité contrôlée et un diamètre de fibres à l'échelle nanométrique simulant les propriétés des tissus naturels, et favorisant ainsi l'adhérence des cellules endothéliales [91]. En effet, tous les éléments structurels tels que la matrice extracellulaire et les processus biologiques se produisent à cette l'échelle nanométrique.

Tel qu'énoncé précédemment, l'objectif de ce projet était d'évaluer le comportement de cellules endothéliales (HAoEC) inoculées sur ces fibres nanométriques de PET (non-modifiées), et exposées à des conditions dynamiques de flux variables. La base de cette étude s'appuie sur le fait que le cisaillement soit une force qui agisse directement sur les cellules endothéliales et influence

la régulation de l'homéostasie de l'endothélium [63], la morphologie du cytosquelette cellulaire (fibres d'actines), et le remodelage du tissu (unions entre cellules via la VE-cadhérine), pour favoriser toutes les fonctions cellulaires [70], [64]. Un endothélium sain possède une élasticité et une capacité d'adaptation similaires aux vaisseaux naturels [56].

Une plage de valeurs physiologiques de cisaillement ($5,12$ et 26 dyn cm^{-2}) à l'intérieur des artères, telle qu'indiqué dans la littérature [97], a donc été établie pour analyser l'adhérence cellulaire, et de cette façon, fournir un diagnostic du tissu endothélial ayant été soumis à ces conditions de stress dynamiques. Pour commencer, et avant les tests dynamiques, les cellules ont été inoculées sur les surfaces de PET, sous condition statiques (48 h), fait qui pourrait être en faveur de la synthèse, le repliement et le positionnement de certaines protéines du cytosquelette, tels que les fibres d'actines [92], et des intégrines qui maintiendraient les cellules liées à la surface du polymère. Aussi, cet effet pourrait favoriser la formation et la maturation des points d'adhérence sur les fibres de PET. L'étape suivante correspondait alors à l'évaluation dynamique. Pour ce faire, nous avons tout d'abord modifié la configuration d'une chambre d'essais en écoulement permettant un flux laminaire. Ces tests de stress dynamiques ont été réalisés afin de caractériser les changements induits dans la distribution du cytosquelette et le déroulement des protéines d'adhérence comme réponse à l'influence mécanique.

L'évaluation des résultats a été réalisée par la qualification du comportement cellulaire, révélée par le marquage des fibres d'actine et de la cadhérine vasculaire. Cette dernière étant utilisée comme moyen d'évaluation de l'intégrité du tissu et du contrôle des contacts entre les cellules.

L'étude a montré que la morphologie des cellules évoluait avec le temps et que ces cellules répondaient au stimulus mécanique du cisaillement en modifiant la conformation de leur cytosquelette (fibres d'actine). Ces changements leur ont probablement permis de s'adapter et de rester adhérentes à la surface du tissu malgré un stress de 20 min ou de 6 h. Après 6 h, les cellules montrent un comportement semblable à celui trouvé en conditions d'adaptation physiologique. Elle s'étendent en formant des doigts, à travers de mouvements de rétraction et d'extension, tel qu'est expliqué par Vogel et al [67], ce qui pourrait leur permettre de tester leur environnement et

de s'attacher au substrat [93], [94]. De plus, une maturation des contacts entre les cellules est observée par la réorganisation de la cadhérine vasculaire et la formation de liaisons fortes entre les cellules, telles que révélées par le détachement de grands regroupements cellulaires après 6 et 12 h sous conditions extrêmes 26 dyn cm^{-2} . Cependant, un test supplémentaire de 24 h à 26 dyn cm^{-2} (données non présentées) a mené au détachement total des cellules de la surface, suggérant une perturbation de l'équilibre entre la force d'adhérence avec le substrat (cell-surface) et les forces entre les cellules « cell-cell junctions ». On considère que les cellules n'ont pas été capables de tester la rigidité de la surface ainsi que synthétiser des liaisons avec un temps de vie adéquat qui permettrait la motilité cellulaire sans avoir de détachement.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce travail apporte un nouvel éclairage sur la capacité des fibres nanométriques de PET électrofilées organisées en une surface non tissée à supporter l'adhésion de cellules endothéliales et à en promouvoir la colonisation en un tapis cellulaire. Ce projet s'insère dans un projet de grande envergure cherchant à mettre au point une option viable, réalisable et effective pour le développement de vaisseaux sanguins synthétiques de petit diamètre. Dans ce mémoire, nous montrons pour la première fois, des résultats sur l'adhérence et le comportement des cellules endothéliales inoculées sur nos nano-surfaces de PET, sous conditions dynamiques. Notre apport principal a été de démontrer clairement que les cellules endothéliales (HAoEC) adhèrent efficacement sur les nano-fibres de PET, sous ces conditions, établissant des points d'adhésion primaires avec la surface. Ces cellules ont répondu de manière physiologique et ont adopté une conformation morphologique associée aux processus naturels *in situ*. Ces résultats nous ont également permis de confirmer que les cellules adhèrent aux nano-fibres de PET à nue, i.e. non modifiées par l'ajout de groupes fonctionnels à la surface. On pourrait aussi attribuer cet effet d'adhésion à la structure nanométrique et à la topographie des fibres de PET qui ont permis le développement d'une quantité importante de points d'adhésion primaires, permettant de garder l'équilibre du système sous conditions dynamiques, jusqu'à un certain moment (20 min, 6 h, 12 h). Le détachement ultime (24 h) des cellules pourrait être expliqué par la rupture de l'équilibre des forces intra et extracellulaires (les forces entre les cellules, les forces d'adhésion sur la surface et la force de cisaillement), ou par le manque de maturation des points d'adhésion. Cependant, nos résultats montrent une amélioration significative de l'adhésion cellulaire avec l'utilisation de fibres nanométriques de PET, comparativement aux résultats d'adhésion cellulaire obtenus sur des surfaces micrométriques du même matériau par Moreno et al. [95], où des pourcentages d'adhésion de seulement 30% sont observés après 10 minutes sous conditions dynamiques.

Ce travail met donc en évidence le besoin de traiter l'aspect mécanique de la cellule et de son environnement de façon détaillé, comme partie essentielle pour permettre l'adhérence cellulaire

et obtenir la morphologie adéquate du tissu. On peut alors conclure que les caractéristiques du polymère doivent permettre à chaque cellule de synthétiser une quantité suffisante de points d'adhésion, homogènes, et avec une géométrie spécifique sur la surface d'adhésion. Des plus, chaque liaison doit être capable de supporter une force assez importante afin d'éviter le détachement causé par la force de cisaillement.

De manière générale, il est important de voir la force de cisaillement comme une force qui stimule le comportement cellulaire et qui va déterminer le signal (i.e. la force) que la cellule impartira sur les molécules (ici, des protéines) reliées à la distribution du cytosquelette, aux renforcements des points d'adhésion, au temps de vie de ceux-ci, et au reste des processus biologiques déterminés par l'influence mécanique, tels que la différenciation, la migration et l'apoptose cellulaire. Toutes ces fonctions dépendraient de la capacité d'adhésion des cellules. Donc, pour la création d'un endothélium (*in vitro*) bien structuré et en bonne santé sur des surfaces électrofilées de PET, il semble requis que la surface des fibres soient modifiée de manière à être plus réceptives à l'établissement de points d'adhésion stables dans le temps. Les fibres pourraient donc, soit être revêtues d'une matière favorisant expressément la formation de points d'adhésions focales robustes et précis, ou traitée en surface chimiquement ou biochimiquement par le greffage de peptides ou protéines favorisant spécifiquement l'adhésion cellulaire.

On suggère donc la création de différentes nanostructures de PET ainsi que la modification de leurs surfaces avec différentes techniques ou revêtements afin par la suite de les utiliser et réaliser la culture cellulaire *in vitro*, accompagnée d'analyses dynamiques du comportement cellulaire. L'utilisation d'un système microfluidique qui aide à recréer des conditions géométriques plus réelles est fortement encouragée, ainsi qu'un système 3D qui permet l'évaluation de la morphologie cellulaire sous conditions de flux laminaire et turbulent, car comme il est indiqué dans les résultats montrés par Rouleau et al. [96], la réponse cellulaire pourrait ne pas seulement être influencée par la valeur du cisaillement imposé, mais aussi par le gradient de la vitesse. Parallèlement, le développement des modèles métaboliques pourrait aider à comprendre quel type exact de molécules sont activées à cause de l'effet mécanique du cisaillement, quelles

conformations structurelles protéiques sont adoptées et de cette façon, étudier les fonctions cellulaires affectées. On suggère fortement l'utilisation des techniques telles que l'imagerie de résonance magnétique (IRM : Interference Reflection Microscopy) pour mesurer l'énergie d'adhésion cellulaire sur la surface et la microscopie à sonde locale qui va permettre d'observer chaque atome et mesurer la force existant entre chaque biomolécule et le PET.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Chlupac, E. Filova, et L. Bacakova, "Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery," *Physiological Research*, vol. 58, pp. S119-S139, 2009.
- [2] E. Kieffer, D. Gomes, L. Chiche, M. H. Fleron, F. Koskas, et A. Bahnini, "Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients," *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, vol. 39, no. 5, pp. 1009-17, 2004.
- [3] A. V. Hurt, M. Batello-Cruz, B. J. Skipper, S. R. Teaf, et W. A. Sterling, Jr., "Bovine carotid artery heterografts versus polytetrafluoroethylene grafts. A prospective, randomized study," *American journal of surgery*, vol. 146, no. 6, pp. 844-7, 1983.
- [4] E. S. Chemla et M. Morsy, "Randomized clinical trial comparing decellularized bovine ureter with expanded polytetrafluoroethylene for vascular access," *The British journal of surgery*, vol. 96, no. 1, pp. 34-9, 2009.
- [5] B. C. Isenberg, C. Williams, et R. T. Tranquillo, "Small-diameter artificial arteries engineered in vitro," *Circulation research*, vol. 98, no. 1, pp. 25-35, 2006.
- [6] B. L. Seal, T. C. Otero, et A. Panitch, "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration," *Materials Science & Engineering R-Reports*, vol. 34, no. 4-5, pp. 147-230, 2001.
- [7] B. Geiger et D. Ginsberg, "The cytoplasmic domain of adherens-type junctions," *Cell motility and the cytoskeleton*, vol. 20, no. 1, pp. 1-6, 1991.
- [8] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, et K. W. Leong, "Biomedical applications of polymer-composite materials: a review," *Composites Science and Technology*, vol. 61, no. 9, 2001.
- [9] H. Suh, "Recent advances in biomaterials," *Yonsei Medical Journal*, vol. 39, no. 2, 1998.
- [10] D. J. Blackwood, "Biomaterials: Past successes and future problems," *Corrosion Reviews*, vol. 21, no. 2-3, 2003.
- [11] V. A. Dubok, "Bioceramics - Yesterday, today, tomorrow," *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, vol. 39, no. 7-8, 2000.
- [12] N. Angelova et D. Hunkeler, "Rationalizing the design of polymeric biomaterials," *Trends in Biotechnology*, vol. 17, no. 10, 1999.

- [13] B. D. Ratner et S. J. Bryant, "Biomaterials: Where we have been and where we are going," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 6, 2004.
- [14] B. D. Ratner, "Surface modification of polymers for biomedical applications: Chemical, biological, and surface analytical challenges," *Surface Modification of Polymeric Biomaterials*, 1997.
- [15] J. M. Goddard et J. H. Hotchkiss, "Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 7, 2007.
- [16] H. S. Yoo, T. G. Kim, et T. G. Park, "Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 12, 2009.
- [17] S. C. Baker, N. Atkin, P. A. Gunning, N. Granville, K. Wilson, D. Wilson, et J. Southgate, "Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies," *Biomaterials*, vol. 27, no. 16, 2006.
- [18] T. I. Croll, A. J. O'Connor, G. W. Stevens, et J. J. Cooper-White, "Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 2, 2004.
- [19] S. Turmanova, M. Minchev, K. Vassilev, et G. Danev, "Surface grafting polymerization of vinyl monomers on poly(tetrafluoroethylene) films by plasma treatment," *Journal of Polymer Research*, vol. 15, no. 4, 2008.
- [20] Z. W. Ma, M. Kotaki, T. Yong, W. He, et S. Ramakrishna, "Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering," *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, 2005.
- [21] J. Wang, N. Huang, P. Yang, Y. X. Leng, H. Sun, Z. Y. Liu, et P. K. Chu, "The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion," *Biomaterials*, vol. 25, no. 16, pp. 3163-70, 2004.
- [22] A. Hadjizadeh, A. Ajji, et M. N. Bureau, "Nano/micro electro-spun polyethylene terephthalate fibrous mat preparation and characterization," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 4, no. 3, pp. 340-51, 2011.
- [23] S. Dimitrievska, A. Petit, A. Ajji, M. N. Bureau, et L. Yahia, "Biocompatibility of novel polymer-apatite nanocomposite fibers," *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 84, no. 1, pp. 44-53, 2008.
- [24] A. Hadjizadeh, A. Ajji, et M. N. Bureau, "Preparation and characterization of NaOH treated micro-fibrous polyethylene terephthalate nonwovens for biomedical application,"

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, vol. 3, no. 8, pp. 574-83, 2010.

- [25] S. Venkatraman, F. Boey, et L. L. Lao, "Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired," *Progress in Polymer Science*, vol. 33, no. 9, pp. 853-874, 2008.
- [26] L. Xue et H. P. Greisler, "Biomaterials in the development and future of vascular grafts," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 37, no. 2, 2003.
- [27] D. B. Nunn, M. M. Carter, M. T. Donohue, et P. C. Hudgins, "POSTOPERATIVE DILATION OF KNITTED DACRON AORTIC BIFURCATION GRAFT," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 12, no. 3, 1990.
- [28] Y. Alimi, C. Juhan, N. Morati, N. Girard, et S. Cohen, "Dilation of woven and knitted aortic prosthetic grafts: CT scan evaluation," *Annals of vascular surgery*, vol. 8, no. 3, 1994.
- [29] S. Ravi et E. L. Chaikof, "Biomaterials for vascular tissue engineering," *Regenerative Medicine*, vol. 5, no. 1, 2010.
- [30] S. G. Friedman, R. S. Lazzaro, L. N. Spier, C. Moccio, et A. J. Tortolani, "A PROSPECTIVE RANDOMIZED COMPARISON OF DACRON AND POLYTETRAFLUOROETHYLENE AORTIC BIFURCATION GRAFTS," *Surgery*, vol. 117, no. 1, 1995.
- [31] W. M. Abbott, R. M. Green, T. Matsumoto, J. R. Wheeler, N. Miller, F. J. Veith, W. D. Suggs, L. Hollier, S. Money, H. E. Garrett, W. S. Moore, R. H. Dean, J. L. Cronenwett, S. Carter, R. M. Greenhalgh, et T. F. Odonnell, "Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: Results of a multicenter randomized prospective trial," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 25, no. 1, 1997.
- [32] R. M. Green, W. M. Abbott, T. Matsumoto, J. R. Wheeler, N. Miller, F. J. Veith, S. Money, H. E. Garrett, et G. Above-Knee Femoropopliteal Study, "Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: Five-year results of a randomized trial," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 31, no. 3, 2000.
- [33] P. Polterauer, M. Prager, T. Holzenbein, J. Karner, G. Kretschmer, et M. Schemper, "DACRON VERSUS POLYTETRAFLUOROETHYLENE FOR Y-AORTIC BIFURCATION GRAFTS - A 6-YEAR PROSPECTIVE, RANDOMIZED TRIAL," *Surgery*, vol. 111, no. 6, 1992.
- [34] W. C. Johnson, K. K. Lee, et S. Vet Affairs Cooperative, "Comparative evaluation of externally supported Dacron and polytetrafluoroethylene prosthetic bypasses for

- femorofemoral and axillofemoral arterial reconstructions," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 30, no. 6, 1999.
- [35] A. Frenot et I. S. Chronakis, "Polymer nanofibers assembled by electrospinning," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 8, no. 1, 2003.
 - [36] D. Liang, B. S. Hsiao, et B. Chu, "Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 59, no. 14, pp. 1392-412, 2007.
 - [37] W. E. Teo et S. Ramakrishna, "A review on electrospinning design and nanofibre assemblies," *Nanotechnology*, vol. 17, no. 14, 2006.
 - [38] D. H. Reneker et I. Chun, "Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning," *Nanotechnology*, vol. 7, no. 3, pp. 216-223, 1996.
 - [39] A. Eftekhari, *Nanostructured conductive polymers*, Chichester, West Sussex, U.K. ; Hoboken, N.J.: Wiley, 2010.
 - [40] S. Ramakrishna, S. Liao, K. Ma, et C. K. Chan, "ENGINEERED NANOFIBERS WITH STEM CELLS FOR BIOMIMETIC TISSUE ENGINEERING," *Advances in Biomedical and Biomimetic Materials*, vol. 206, 2009.
 - [41] A. Hadjizadeh, C. J. Doillon, et P. Vermette, "Bioactive polymer fibers to direct endothelial cell growth in a three-dimensional environment," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 3, pp. 864-73, 2007.
 - [42] A. Hadjizadeh et C. J. Doillon, "Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 4, no. 7, pp. 524-531, 2010.
 - [43] Z. W. Ma, M. Kotaki, R. Inai, et S. Ramakrishna, "Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds," *Tissue Engineering*, vol. 11, no. 1-2, 2005.
 - [44] W. J. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, et F. K. Ko, "Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 60, no. 4, 2002.
 - [45] U. Hersel, C. Dahmen, et H. Kessler, "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, 2003.
 - [46] H. C. H. Ko, B. K. Milthorpe, et C. D. McFarland, "Engineering thick tissues - The vascularisation problem," *European Cells & Materials*, vol. 14, 2007.

- [47] H.-K. Lao, E. Renard, I. Linossier, V. Langlois, et K. Vallee-Rehel, "Modification of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film by chemical graft copolymerization," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 2, 2007.
- [48] R. Langer et J. P. Vacanti, "TISSUE ENGINEERING," *Science*, vol. 260, no. 5110, 1993.
- [49] S. E. Sakiyama-Elbert et J. A. Hubbell, "Functional biomaterials: Design of novel biomaterials," *Annual Review of Materials Research*, vol. 31, 2001.
- [50] O. F. Khan et M. V. Sefton, "Endothelial cell behaviour within a microfluidic mimic of the flow channels of a modular tissue engineered construct," *Biomedical microdevices*, vol. 13, no. 1, pp. 69-87, 2011.
- [51] L. L. Chiu et M. Radisic, "Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues," *Biomaterials*, vol. 31, no. 2, pp. 226-41, 2010.
- [52] K. Kyriakidou, G. Lucarini, A. Zizzi, E. Salvolini, M. M. Belmonte, F. Mollica, A. Gloria, et L. Ambrosio, "Dynamic co-seeding of osteoblast and endothelial cells on 3D polycaprolactone scaffolds for enhanced bone tissue engineering," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, vol. 23, no. 3, pp. 227-243, 2008.
- [53] A. P. McGuigan et M. V. Sefton, "Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 31, pp. 11461-11466, 2006.
- [54] S. M. Albelda et C. A. Buck, "Integrins and other cell adhesion molecules," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 4, no. 11, pp. 2868-80, 1990.
- [55] H. F. Lodish, *Molecular cell biology*, 6th^e éd., New York: W.H. Freeman, 2008.
- [56] K. A. Pasyk et B. A. Jakobczak, "Vascular endothelium: recent advances," *European journal of dermatology : EJD*, vol. 14, no. 4, pp. 209-13, 2004.
- [57] J. J. Chiu et S. Chien, "Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives," *Physiological reviews*, vol. 91, no. 1, pp. 327-87, 2011.
- [58] Y. S. J. Li, J. H. Haga, et S. Chien, "Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells," *Journal of biomechanics*, vol. 38, no. 10, pp. 1949-1971, 2005.

- [59] D. Steinberg, "Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime," *Nature Medicine*, vol. 8, no. 11, pp. 1211-1217, 2002.
- [60] D. E. Discher, P. Janmey, et Y. L. Wang, "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate," *Science*, vol. 310, no. 5751, 2005.
- [61] D. E. Ingber, "Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again," *Faseb Journal*, vol. 20, no. 7, pp. 811-827, 2006.
- [62] P. F. Davies, "Flow-mediated endothelial mechanotransduction," *Physiological reviews*, vol. 75, no. 3, pp. 519-60, 1995.
- [63] C. Cheng, D. Tempel, R. van Haperen, A. van der Baan, F. Grosveld, M. J. A. P. Daemen, R. Krams, et R. de Crom, "Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress," *Circulation*, vol. 113, no. 23, pp. 2744-2753, 2006.
- [64] Y. F. Han, S. C. Cowin, M. B. Schaffler, et S. Weinbaum, "Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 47, 2004.
- [65] P. F. Davies, J. A. Spaan, et R. Krams, "Shear stress biology of the endothelium," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 33, no. 12, 2005.
- [66] S. Chien, "Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 292, no. 3, 2007.
- [67] V. Vogel et M. Sheetz, "Local force and geometry sensing regulate cell functions," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 4, 2006.
- [68] A. Hartsock et W. J. Nelson, "Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton," *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, vol. 1778, no. 3, 2008.
- [69] K. E. Kadler, A. Hill, et E. G. Canty-Laird, "Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 20, no. 5, 2008.
- [70] G. M. Riha, P. H. Lin, A. B. Lumsden, Q. Z. Yao, et C. Y. Chen, "Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 33, no. 6, 2005.

- [71] V. Vogel, "Mechanotransduction involving multimodular proteins: Converting force into biochemical signals," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 35, 2006.
- [72] G. S. Kendall, M. Hirstova, S. Horn, D. Dafou, A. Acosta-Saltos, B. Almolda, V. Zbarsky, P. Rumajogee, H. Heuer, B. Castellano, K. Pfeffer, S. A. Nedospasov, D. M. Peebles, et G. Raivich, "TNF gene cluster deletion abolishes lipopolysaccharide-mediated sensitization of the neonatal brain to hypoxic ischemic insult," *Laboratory Investigation*, vol. 91, no. 3, pp. 328-341, 2011.
- [73] R. O. Hynes, "Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines," *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673-687, 2002.
- [74] S. Pellegrin et H. Mellor, "Actin stress fibres," *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 20, pp. 3491-3499, 2007.
- [75] E. Frixione, "Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: A 300-year epic," *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 46, no. 2, 2000.
- [76] J. M. Goffin, P. Pittet, G. Csucs, J. W. Lussi, J. J. Meister, et B. Hinz, "Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers," *The Journal of cell biology*, vol. 172, no. 2, pp. 259-68, 2006.
- [77] R. O. Hynes, "Cell-matrix adhesion in vascular development," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, 2007.
- [78] S. Wiesner, A. Lange, et R. Faessler, "Local call: from integrins to actin assembly," *Trends in Cell Biology*, vol. 16, no. 7, 2006.
- [79] A. J. Ridley et A. Hall, "The Small Gtp-Binding Protein Rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth-Factors," *Cell*, vol. 70, no. 3, pp. 389-399, 1992.
- [80] D. Riveline, E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, et A. D. Bershadsky, "Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism," *The Journal of cell biology*, vol. 153, no. 6, pp. 1175-86, 2001.
- [81] A. Besser et U. S. Schwarz, "Coupling biochemistry and mechanics in cell adhesion: a model for inhomogeneous stress fiber contraction," *New Journal of Physics*, vol. 9, 2007.
- [82] M. G. Lampugnani, A. Zanetti, F. Breviario, G. Balconi, F. Orsenigo, M. Corada, R. Spagnuolo, M. Betson, V. Braga, et E. Dejana, "VE-cadherin regulates endothelial actin

- activating Rac and increasing membrane association of Tiam," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 1175-1189, 2002.
- [83] S. Gory-Faure, M. H. Prandini, H. Pointu, V. Roullot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet, et P. Huber, "Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis," *Development*, vol. 126, no. 10, pp. 2093-2102, 1999.
 - [84] D. Vestweber, "VE-cadherin - The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation," *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 28, no. 2, pp. 223-232, 2008.
 - [85] A. K. Harris, P. Wild, et D. Stopak, "Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion," *Science*, vol. 208, no. 4440, pp. 177-9, 1980.
 - [86] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, et D. E. Discher, "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification," *Cell*, vol. 126, no. 4, 2006.
 - [87] K. Kendall, *Adhesion of cells, viruses and nanoparticles*, New York: Springer, 2010.
 - [88] M. Antia, G. Baneyx, K. E. Kubow, et V. Vogel, "Fibronectin in aging extracellular matrix fibrils is progressively unfolded by cells and elicits an enhanced rigidity response," *Faraday Discussions*, vol. 139, 2008.
 - [89] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, et D. E. Ingber, "Geometric control of cell life and death," *Science*, vol. 276, no. 5317, pp. 1425-8, 1997.
 - [90] M. Prager, P. Polterauer, H. J. Bohmig, O. Wagner, A. Fugl, G. Kretschmer, M. Plohner, J. Nanobashvili, et I. Huk, "Collagen versus gelatin-coated Dacron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery: Results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial," *Surgery*, vol. 130, no. 3, 2001.
 - [91] A. Hadjizadeh, A. Ajji, M. Jolicoeur, B. Liberelle, et G. De Crescenzo, "Fiber diameter, orientation and surface properties of electrospun polyethylene terephthalate fibrous mats influence HAoEC response.," 2012.
 - [92] D. Raucher et M. P. Sheetz, "Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension," *Journal of Cell Biology*, vol. 148, no. 1, 2000.
 - [93] S. L. Gupton et F. B. Gertler, "Filopodia: the fingers that do the walking," *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, vol. 2007, no. 400, 2007.
 - [94] O. Medalia, M. Beck, M. Ecke, I. Weber, R. Neujahr, W. Baumeister, et G. Gerisch, "Organization of actin networks in intact filopodia," *Current Biology*, vol. 17, no. 1, 2007.
 - [95] M. J. Moreno, A. Ajji, D. Mohebbi-Kalhari, M. Rukhlova, A. Hadjizadeh, M. N. Bureau, "Development of a compliant and cytocompatible micro-fibrous polyethylene

- terephthalate vascular scaffold" *Journal of Biomedical Materials Research. Part B.* vol. 97, no. 2011.
- [96] L. Rouleau, M. Farcas, J. Tardif, R. Mongrain, R.L. Leask, "Endothelial cell morphologic response to asymmetric stenosis hemodynamics: Effects of spatial wall shear stress gradients", *Journal of Biomechanical Engineering.* vol. 132, 2010.
 - [97] H. Inoguchi, T. Tanaka, Y. Maehara, T. Matsuda, "The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft", *Biomaterials.* vol. 28, 2007.
 - [98] J. Tavares, E. Swanson, S. Coulombe, "Plasma synthesis of coated metal nanoparticles with surface properties tailored for dispersion". *Plasma Processes and Polymers.* vol. 5, 2008.